



TITLE:

細胞周期と細胞形態形成を調節する蛋白質脱リン酸化酵素(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

島貫, 瑞樹

---

CITATION:

島貫, 瑞樹. 細胞周期と細胞形態形成を調節する蛋白質脱リン酸化酵素.  
京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3075839>

RIGHT:

学位申請論文

細胞周期と細胞形態形成を調節する蛋白質脱リン酸化酵素

島貫瑞樹

## 目次

### 要旨 序論

1  
2

細胞周期制御におけるリン酸化・脱リン酸化の重要性  
プロテインフォスファターゼのこれまでの研究  
プロテインフォスファターゼの分類  
PP1様フォスファターゼの細胞周期制御における役割  
PP2A様フォスファターゼの細胞周期制御における役割  
研究の経緯

### 結果

12

ppe1+遺伝子はプロテインフォスファターゼをコードする  
ppe1+遺伝子破壊は、生育の低温感受性と  
細胞形態異常および接合能の欠損を引き起こす  
△ppe1の低温感受性表現型の多コピーサプレッサー  
出芽酵母のSIT4遺伝子も多コピーサプレッサーである  
多コピーサプレッサーによる細胞形態異常の抑制  
ppe1+遺伝子と必須機能を共有する遺伝子  
ppe1+遺伝子産物の同定  
ppe1と直接相互作用する蛋白質  
ppe1+遺伝子過剰発現の細胞分裂における効果  
ppe1+遺伝子産物の細胞内局在  
ppe1+遺伝子の染色体上の位置

新しいフォスファターゼ遺伝子ppe2+

32

ppe2+遺伝子の多コピー導入は

ppe1+遺伝子破壊株の表現型を抑制する  
ppe2+遺伝子は増殖に必須でない  
ppe2+遺伝子の過剰発現の効果  
ppe2+遺伝子産物の同定  
ppe2+遺伝子産物の細胞内局在

考察	49
ppe1+遺伝子の必須機能	
細胞長の変化について	
細胞形態の変化について	
接合能の欠損について	
関連因子について	
2A型フォスファターゼ関連、ppa1+/ppa2+遺伝子	
ppe2+遺伝子	
dis3+遺伝子	
PKC関連、pck1+遺伝子	
pim1+遺伝子	
sts5+遺伝子とsupA遺伝子	
p130	
材料と方法	56
補遺	
pap1+依存的転写活性を制御する増殖必須遺伝子pad1+	59
文献	78
謝辞	86



## 要旨

分裂酵母の新しいセリンスレオニン特異的プロテインフォスファターゼをコードする遺伝子ppe1<sup>+</sup>は、1型フォスファターゼと2A型フォスファターゼの類似性を利用したハイブリダイゼーションのスクリーニングによって、2A型に相同なフォスファターゼをコードする2つの遺伝子ppa1<sup>+</sup>、ppa2<sup>+</sup>と共に、大倉らにより単離された。本研究では、ppe1フォスファターゼの細胞機能の解析を目指した。

ppe1の他のフォスファターゼに対する予想アミノ酸配列の相同性は、分裂酵母ppa2 (53%)、dis2 (39%) であった。ppe1に対する抗体は、分裂酵母の37kdのポリペプチドを認識した。遺伝子破壊は低温感受性致死と細胞形態の変化（短く、洋なし形になる）を引き起こした。これらの表現型はppe1<sup>+</sup>遺伝子を持つプラスミドの導入によって完全に相補された。以下に示す4種類の多コピーサプレッサー遺伝子が同定された。1) 2A型フォスファターゼをコードするppa1<sup>+</sup>遺伝子およびppa2<sup>+</sup>遺伝子。2) 有糸分裂に必須な遺伝子dis3<sup>+</sup>遺伝子、これは、出芽酵母のsit4変異の多コピーサプレッサーであるSSD1/SRK1遺伝子と類似性を持っている。3) プロテインキナーゼC様のキナーゼをコードするpck1<sup>+</sup>遺伝子。4) 本研究によって単離された新しいフォスファターゼをコードするppe2<sup>+</sup>遺伝子。また、予想されたとおり、出芽酵母のSIT4遺伝子もppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株の多コピーサプレッサーであった。ppe1プロテインフォスファターゼは、細胞の形態形成と有糸分裂においてこれらの多コピーサプレッサー遺伝子産物を制御するもしくはこれらに制御されることにより機能を果たしているのかもしれない。

また、ppe1<sup>+</sup>遺伝子をプローブとしたハイブリダイゼーションによって、新しいフォスファターゼ遺伝子ppe2<sup>+</sup>を単離した。ppe2<sup>+</sup>遺伝子は、△ppe1変異の多コピーサプレッサーでもあった。他のフォスファターゼに対する相同性は、ppe1(60%)、ppa2(59%)、dis2(45%)、ウサギPPX(72%)であった。ppe2は、相同性を持つ部分に他のフォスファターゼには見られない、特徴的な挿入配列を持っていた。ppe2<sup>+</sup>遺伝子は生育に必須ではなかった。ppe2<sup>+</sup>遺伝子産物は細胞内で核、特にクロマチン領域に局在した。

## 序論

### 細胞周期制御におけるリン酸化・脱リン酸化の重要性

細胞周期の進行において、生体反応をつかさどる分子はダイナミックに変動し、その制御に蛋白質のリン酸化・脱リン酸化のような可逆的な翻訳後修飾が関与することが知られている。

細胞周期の研究はMPF (M期促進因子) /サイクリン・cdc2キナーゼの発見によってめざましく発展した(Masui et al., 1971; Smith et al., 1971)。MPFは、成熟過程で第一減数分裂前期に停止した卵細胞に対して、減数分裂を進行せしめ卵成熟を誘導する卵成熟促進因子として発見された。

その後、細胞周期特異的停止の表現型を示す突然変異体の研究からcdc2キナーゼが発見された。さらに、ウニの卵割周期に伴って劇的な量変動を示す蛋白質として発見されていたサイクリンがcdc2と複合体を形成し、この複合体がMPFの実体であることが示された(Lohka et al., 1988; Gautier et al., 1988; Dunphy et al., 1988)。MPF/サイクリン・cdc2キナーゼは、有糸分裂においても、酵母のような下等真核生物からヒトのような高等真核生物まで、広く保存されていることがわかった(Lee and Nurse 1987)。

サイクリンは間期に徐々に蓄積し、M期中期から後期移行時に劇的に分解される。この周期的変動は、MPF活性の変動と一致しており、サイクリンがMPFの制御サブユニットと考えられる所以であるが、サイクリン・cdc2キナーゼ複合体は、さらに、リン酸化・脱リン酸化の翻訳後修飾によって制御されている(Gould et al., 1989)。サイクリンと結合したcdc2キナーゼは、ATP結合ドメインの近傍にあたる15位のチロシン残基(Y15)をwee1キナーゼによってリン酸化され、不活性化されている。MPFの活性化には、cdc25フォスファターゼによるY15の脱リン酸化が必要であり、このステップがM期への進入を決める鍵の一つである(Dunphy et al., 1991; Gautier et al., 1991)。もう一カ所、cdc2キナーゼの167位のスレオニン残基(T167)がリン酸化されることが知られているが、このリン酸化はMPF活性に必須であり、触媒活性ポケットの形成とサイクリンの結合に関係すると考えられている。

また、wee1/mik1キナーゼおよびcdc25フォスファターゼも、それぞれ、リン酸化・脱リン酸化の制御下にあることが示唆されており(Millar et al., 1992a, 1992b; Parker et al., 1993; Wu et al., 1993)、細胞周期制御においてもリン酸化脱・リン酸化カスケードは複雑なネットワークを形成しているらしい。

表 1. 分裂酵母のプロテインホスファターゼ

遺伝子	型	アミノ酸特異性	遺伝子破壊
<i>dis2</i> <sup>+</sup>	1	セリン/スレオニン	生育可能 注1
<i>sds21</i> <sup>+</sup>	1	セリン/スレオニン	生育可能 注1
<i>ppa1</i> <sup>+</sup>	2A	セリン/スレオニン	生育可能 注2
<i>ppa2</i> <sup>+</sup>	2A	セリン/スレオニン	生育可能 注2
<i>ppe1</i> <sup>+</sup>	中間	セリン/スレオニン	生育可能 注3
<i>ppe2</i> <sup>+</sup>	中間	セリン/スレオニン	
<i>ppb1</i> <sup>+</sup>	2B	セリン/スレオニン	生育可能
<i>ptc1</i> <sup>+</sup>	2C	セリン/スレオニン	生育可能
<i>ptc2</i> <sup>+</sup>	2C	セリン/スレオニン	生育可能
<i>cdc25</i> <sup>+</sup>	<i>cdc25</i>	チロシン	致死 注4
<i>pyp1</i> <sup>+</sup>	PTP	チロシン	生育可能 注5
<i>pyp2</i> <sup>+</sup>	PTP	チロシン	生育可能 注5
<i>pyp3</i> <sup>+</sup>	PTP	チロシン	生育可能 注5

注1: *dis2*<sup>+</sup>, *sds21*<sup>+</sup>の二重破壊株は致死

注2: *ppa1*<sup>+</sup>, *ppa2*<sup>+</sup>の二重破壊株は致死

注3: *ppe1*<sup>+</sup>, *ppa2*<sup>+</sup>の二重破壊株は致死

注4: *wee1*変異が導入されると生育可能

注5: *pyp1*<sup>+</sup>, *pyp2*<sup>+</sup>の二重破壊株は致死

注6:  $\Delta cdc25$  *wee1*条件下では致死



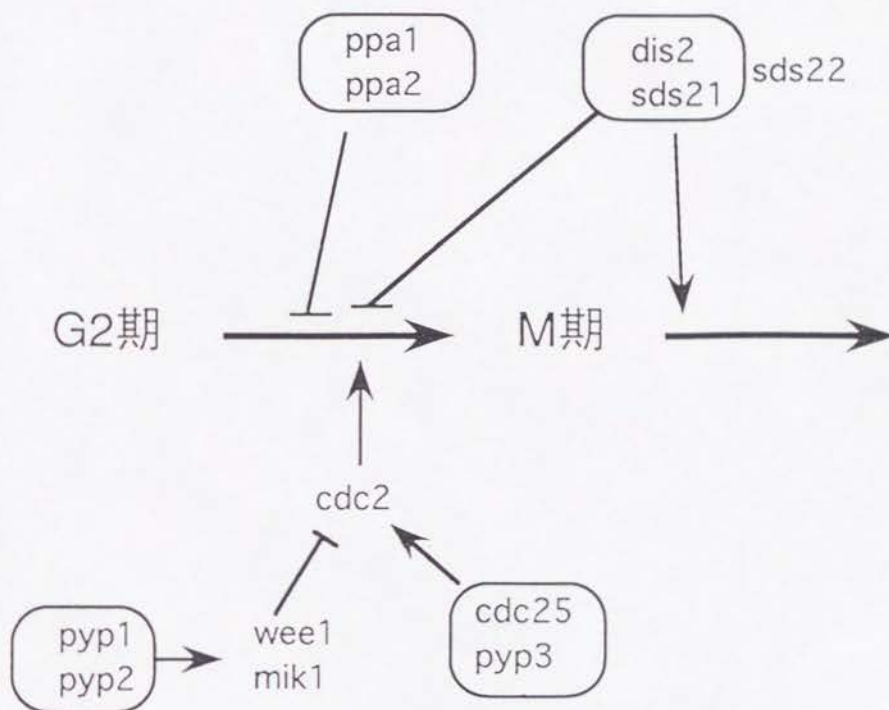


図1. 細胞周期制御における分裂酵母フォスファターゼの役割

囲みを付けたものがフォスファターゼの触媒サブユニット  
先端に矢印は正の制御、横棒は負の制御を表す。

1992; Yoshida et al., unpublished) (図1)。

これらのフォスファターゼが細胞分裂周期において必須であることは、ごく最近確立されたことである。コウジカビ *Aspergillus nidulans* (Doonan et al., 1989)、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (Ohkura et al., 1989)、ショウジョウバエ *Drosophila* (Axton et al., 1990)などの有糸分裂において欠損を持つ突然変異体から、フォスファターゼ遺伝子の変異が発見されている。これらのフォスファターゼ遺伝子産物は、哺乳類の1型フォスファターゼの触媒サブユニット (PP1) と高い相同性を持っている。アミノ酸配列の相同性は、分裂酵母 *dis2* と哺乳類 PP1 で約80%である。PP1様遺伝子が細胞分裂に必須である決定的な証拠は分裂酵母において得られた。すなわち、PP1に高度に類似したポリペプチドをコードする *dis2+* 遺伝子と *sds21+* 遺伝子の二重破壊が致死をもたらすことである。

## PP1様フォスファターゼの細胞周期制御における役割

### 1. M期中期の進行に必須な機能

分裂酵母のPP1様フォスファターゼである *dis2* と *sds21* は、重複する必須機能を担っている。これらの遺伝子の二重破壊株は、致死となるが、プラスミド欠落法によれば、染色体が凝縮し、スピンドルが短いままM期中期プレート様構造の状態で停止している細胞が観察される。(Ohkura et al., 1989)。 *dis2/sds21* 活性は、M期中期から後期への移行に必須であることが示唆される。低温感受性変異株 *dis2-11* の場合では、制限温度下 (20℃) で、染色体は高度に凝縮し、姉妹染色分体は不分離のまま、スピンドルが伸長し、両極に2:1または3:0に染色体が分布して停止する *dis* 表現型を示す (Ohkura et al., 1988)。このとき、制限温度下での *dis2/sds21* に依存したフォスファターゼ活性 (ヒストンH1およびフォスホリラーゼを基質として測定) は非常に低下し (Kinoshita et al., 1990)、H1キナーゼ活性は高いまま維持される (Kinoshita et al., 1991a) ので、M期から間期への移行ができなくなっていると考えられる。 *dis2-11* の変異蛋白質は、野生型 *sds21* 蛋白質の存在にもかかわらず、その活性をも低下させているので、負の優性効果を持つらしい。

### 2. *sds22* 蛋白質による基質特異性の調節

分裂酵母では、細胞周期制御において重要な働きをするPP1様フォスファターゼの調節サブユニットが発見されている。ロイシンに富む22残基を単位とする11回の反復配列を持つ蛋白質をコードする *sds22+* 遺伝子は、 *dis2-11* 変異の多コピーサプレッサー遺伝子



として単離された(Ohkura et al., 1991)。sds22<sup>+</sup>は必須遺伝子で、遺伝子破壊すると致死であるが、プラスミド欠落法で観察される終末表現型は、 $\Delta$ dis2 $\Delta$ sds21二重変異株の表現型と似ており、M期中期プレート様構造を示して停止する。sds22<sup>+</sup>遺伝子産物とdis2/sds21フォスファターゼは、抗dis2抗体と抗sds22抗体のいずれを用いた免疫沈降法によっても共沈し、これらが複合体を形成することが示された。さらに、dis2フォスファターゼの基質特異性が、sds22との結合によって変化することがわかった(Stone et al., 1993)。抗dis2抗体で免疫沈降したものは、フォスホリラーゼとヒストンH1の両方とも良い基質としたが、抗sds22抗体で免疫沈降させたフォスファターゼはヒストンH1のみを良く脱リン酸化した。sds22蛋白質と複合体を作るdis2/sds21フォスファターゼが、サイクリン・cdc2キナーゼによってリン酸化された蛋白質をM期終了時に脱リン酸化する可能性を示して、興味深い。

sds22<sup>+</sup>遺伝子産物はdis2/sds21フォスファターゼの調節サブユニットと考えられるが、sds22の温度感受性変異株では、制限温度下でdis2蛋白質が不安定となり存在量が減少するので、dis2蛋白質の安定性にも関与しているらしい(Stone et al., 1993)。細胞中の全dis2蛋白質の量は、細胞周期を通じて変化しないが、サブユニットとの結合や、細胞内局在の状態によっては、dis2の一部は大きく変動するかもしれない。

## PP2A様フォスファターゼの細胞周期制御における役割

### 1. M期進入のタイミング調節

分裂酵母のPP2A様フォスファターゼは、二つの遺伝子ppa1<sup>+</sup>、ppa2<sup>+</sup>によってコードされている。これらは必須機能を共有しており、ppa2がその主たる担い手である(Kinoshita et al., 1990)。ppa1<sup>+</sup>を遺伝子破壊しても生育可能である。ppa2<sup>+</sup>破壊株は生育可能だが、細胞長が短くなる”semi-wee表現型”を示す。二重破壊株は致死である。この”semi-wee表現型”は、wee表現型(Fantes 1981)に類似し、未成熟な分裂 (premature mitosis)の結果と考えられる。 $\Delta$ ppa2wee1-50二重変異株は致死となり、また、ppa2欠失変異はcdc25-22変異株(Nurse 1976)の温度感受性を部分的に抑制する。これらの結果は、ppa2フォスファターゼが、サイクリン・cdc2キナーゼを負に制御することによってM期開始の制御に関わっていることを示唆する(Kinoshita et al., 1993)。

cdc2キナーゼの活性化因子であるcdc25自身についても、リン酸化・脱リン酸化による活性制御が報告されている(Kumagai and Dunphy, 1992; Izumi et al, 1992)。cdc25はM期



図2. 分裂酵母プロテインフォスファターゼ変異株の表現型

ハーフトーンは染色体領域を、小さい丸はスピンドル極体を示す。細胞内の直線はスピンドル、曲線は細胞質微小管を示す。tsは高温感受性、csは低温感受性、Dは遺伝子破壊、opは大量発現をそれぞれ表す。



開始時にリン酸化を受けて活性化され、cdc2チロシン15を脱リン酸化することによりそのH1キナーゼ活性を上昇させる。フォスファターゼ阻害剤であるオカダ酸（PP2Aを特に強く阻害）は、MPFの活性化を誘導するが、cdc25の脱リン酸化に、オカダ酸感受性のフォスファターゼが関与することが示されている。PP2Aが直接その脱リン酸化を行っているのかどうか、今後解明されるべき問題である。

ppa2蛋白質の細胞内の存在量は細胞周期を通じて一定である。しかし、PP2Aは、60kdと55kdの二つの調節サブユニットを持つことがわかっており、分裂酵母におけるそれらの存在と細胞周期制御における役割について、今後の研究が待たれる。

PP1様のdis2<sup>+</sup>遺伝子とPP2A様のppa2<sup>+</sup>遺伝子は必須機能を共有しない。すなわち、dis2とppa2の二重変異株は生育可能である。dis2およびppa2の変異株がはっきりと異なる表現型を示すことはこの結果と一致するが、このことは、これらの細胞分裂周期における機能が異なることを示唆する。2B型様のフォスファターゼをコードする他の遺伝子も出芽酵母で報告されているが(Cyert et al., 1991; Liu et al., 1991)、遺伝子破壊は生育可能であり、これが細胞の生育に必須ではないことを示唆する。

また、哺乳類チロシンフォスファターゼと相同性を持つ分裂酵母pyp1、pyp2はwee1キナーゼを正に制御し(Ottillie et al., 1991; Millar et al., 1992b)、pyp3はcdc25と同じ経路でcdc2キナーゼの15位のチロシン残基の脱リン酸化を制御していることが示唆されている(Millar et al., 1992a)。

## 研究の経緯

ppe1<sup>+</sup>遺伝子は、大倉らにより、ppa1<sup>+</sup>遺伝子、ppa2<sup>+</sup>遺伝子とともに単離された。

2A型フォスファターゼの分裂酵母における相同遺伝子を単離するため、哺乳類の1型フォスファターゼと2A型フォスファターゼの間で保存されているアミノ酸配列YGFYDECに対応する混合オリゴヌクレオチドを作成し、<sup>32</sup>P標識プローブとして、多コピープラスミドpDB248をベクターとする分裂酵母ゲノムライブラリーに対してゆるい条件でサザンハイブリダイゼーションを行なった。このスクリーニングにより、3種類のプラスミドpPH101、pPH102、pPH104が単離された(Kinoshita et al, 1990)。サブクロニング、塩基配列決定の結果、pPH102、pPH104には、互いに80%の相同性を持ち、哺乳類2A型フォスファターゼに対してそれぞれ78-79%の相同性を持つ蛋白質をコードす

る遺伝子が含まれていた。これらは、ppa1<sup>+</sup>、ppa2<sup>+</sup>と名付けられ、後の解析により、重複した必須機能を担う2A型フォスファターゼ相同遺伝子であることが示された。また、pPH101からは、ppa2に対して54%、dis2に対して43%、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*のSIT4 (Arndt, 1989; Sutton et al., 1991)に対して73%の相同性を持つ蛋白質をコードする遺伝子が発見され、ppe1<sup>+</sup>と名付けた ((Kinoshita et al. 1990)ではppx1<sup>+</sup>) (図3、図4、図5)。ppe1は、出芽酵母SIT4と同様、PP1ともPP2Aとも異なる、新しいサブファミリーに属するセリン・スレオニンフォスファターゼであると考えられる。

本研究は、ppe1<sup>+</sup>と名付けた新しいフォスファターゼ遺伝子の機能解析を目指した。その結果、ppe1<sup>+</sup>遺伝子は、2A型様フォスファターゼ遺伝子ppa1<sup>+</sup>とppa2<sup>+</sup>、PKC様キナーゼ遺伝子pck1<sup>+</sup>、および姉妹染色分体分離に必須な110kdの蛋白質をコードするdis3<sup>+</sup>遺伝子などと機能関連し、細胞制御に多面的に関わっていることが明らかとなった。また、ppe1と相同性を持つ新しいフォスファターゼをコードする遺伝子ppe2<sup>+</sup>を単離し、その解析も行った。

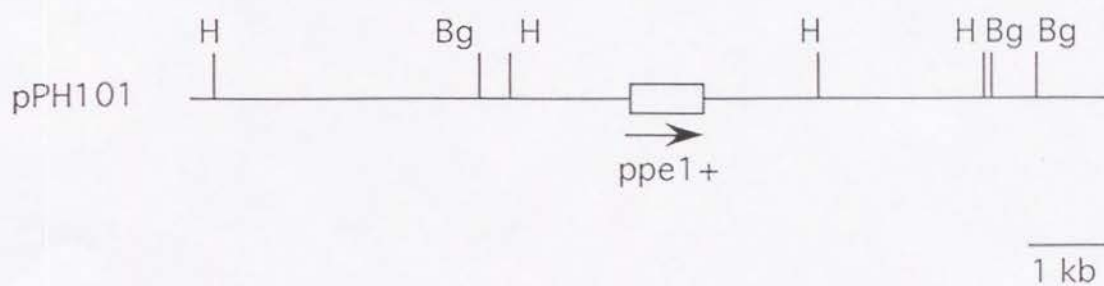


図3. pPH101の制限酵素地図

pPH101中に含まれる分裂酵母ゲノム断片の制限酵素地図を示す。

ppe1+遺伝子のコード領域を四角で表した。

矢印はppe1+遺伝子の向きを示す。

H: HindIII, Bg: BglII,



## 結果

ppe1<sup>+</sup>遺伝子はプロテインフォスファターゼをコードする

分裂酵母ゲノムライブラリーから、2A型様フォスファターゼのアミノ酸コンセンサス配列をコードする20塩基の混合オリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション法でppe1<sup>+</sup>遺伝子が単離された。ppe1<sup>+</sup>遺伝子の塩基配列を決定し、305アミノ酸残基のコード領域を見いだした(図4)。ppe1<sup>+</sup>遺伝子の塩基配列は、Matsumo & Beachによって単離されたesp1<sup>+</sup>遺伝子の塩基配列と同一であった(Matsumoto et al., 1993)。ppe1<sup>+</sup>遺伝子をプローブとしたゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法では、予想されるサイズに単一のバンドのみが検出された。

分裂酵母の他のセリン/スレオニンフォスファターゼとアミノ酸配列を比較すると、ppe1は2A型様フォスファターゼppa2と1型様フォスファターゼdis2に似ていた。dis2に対して(39%同一)よりppa2に対して(53%同一)、よりよく似ていた(図5、表2)。他の生物のフォスファターゼと比較すると*Saccharomyces cerevisiae*のSIT4、*Drosophila*のPPV (Cohen et al., 1990; Mann et al., 1993)、ウサギのPPX (da Cruz e Silva et al., 1988; Brewis et al., 1993)と高い類似性を持っていた。ppe1とこれら3つのフォスファターゼのアミノ酸配列の類似性は両末端付近の僅かの部分を除いては全体にわたって見られた。しかし、カルボキシ末端の残基YFL/Iがppa1、ppa2、ppe1、SIT4、PPH3、PPV、PPXで保存されていた。

ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊は、生育の低温感受性と細胞形態異常および接合能の欠損を引き起こす。

ppe1<sup>+</sup>遺伝子が生育に必須であるかどうか調べるため、*S. pombe*のura4<sup>+</sup>遺伝子を含む1.8kbのDNA断片を用いて遺伝子破壊を行なった(図6a)。得られたヘテロ二倍体のUra<sup>+</sup>形質転換体は、33℃において生育可能な4つの胞子を形成した。ヘテロ二倍体(Δ/−)および一倍体のsegregants(Δまたは−)のゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーションの結果、ppe1<sup>+</sup>の遺伝子破壊によって予想されるサイズ(BglIII消化で8.5kb、HindIII消化で2.0kbと2.1kb)にバンドが検出された(図6b)。これらの結果は、

TCTAGAAGAGATCCTTGAATAATTTGTGCTACAACG	-1
ATGTTTGGACTTGGATGAATGGATCGCTACAGTAAGGAAGTGTAATATCTTCCAGAACAC	+60
M F D L D E W I A T V R K C K Y L P E H	20
CAGTTGAAACGATTGTGTGAGATGGTAAAAGTTATTTTAATGGAGGAGTCCAATATCCAG	+120
Q L K R L C E M V K V I L M E E S N I Q	40
CCTGTGCGGACTCCCGTTACTGTTTGTGGTGATATACATGGTCAGTTTACGACCTTTTG	+180
P V R T P V T V C G D I H G Q F Y D L L	60
GAAGTGTTCGAGTAGGTGGAGAATTGCCAAGCACAATTATATATTTATGGGTGATTTT	+240
E L F R V G G E L P S T N Y I F M G D F	80
GTGGATCGAGGTATTTTAGCTTAGAACTTTTACGTTATTTATGCTTTTGAAAGCAAGG	+300
V D R G Y F S L E T F T L F M L L K A R	100
<u>KpnI</u>	
TACCCAGATAAAATTACATTGCTTCGTGGTAATCACGAAAGTCGCCAGATCACTCAAGTC	+360
Y P D K I T L L R G N H E S R Q I T Q V	120
TACGGGTTTTATGATGAGTGTCAAACCAAATATGGAAATGCAAATGTTTGGAAATATTGT	+420
Y G F Y D E C Q T K Y G N A N V W K Y C	140
<u>SspI</u>	
TGCCAAGTTTTTGGATTTTTTGGCTTTGGCAGCGGTTATCGATAACAAAATTTTTATGCGTG	+480
C Q V F D F L T L A A V I D N K I L C V	160
CATGGTGGATTATCTCCGGAAGTTCGCACATTGGATCAGATTTCGTATTCTTGCGCGTGCT	+540
H G G L S P E V R T L D Q I R I L A R A	180
CAAGAAATCCCCATGAAGGCTCATTTTGGCATTTGATGTGGTCTGATCCAGAGGATATT	+600
Q E I P H E G S F C D L M W S D P E D I	200
GAATCTTGGACTGTTTCGCCTCGGGGAGCTGGATGGTTGTTTGGTCTCTAAAGTTACTACC	+660
E S W T V S P R G A G W L F G S K V T T	220
GAATTTAGTCAAATCAACGACTTGACATTGATTGCTCGTGCATCAACTTGTTCAAGAG	+720
E F S Q I N D L T L I A R A H Q L V Q E	240
GGCTACAAATATCATTTTGGCGATAAAAATCTTGTTACCGTTTGGAGTGCTCCCAATTAC	+780
G Y K Y H F A D K N L V T V W S A P N Y	260
TGCTATAGATGTGGAAATGTGGCAAGTGTTATGAAAGTAGATGAATCTTTGGAACCGGAA	+840
C Y R C G N V A S V M K V D E S L E P E	280
TTTCGTATTTTCTCGGCTGTTGCCGACGAAGATCGTACCGTTCCCCCTAGCAGAAAAAGA	+900
F R I F S A V A D E D R T V P P S R K R	300
AGCGAGTATTTCTAATACTTTGGTATGTGCAAGTCAAATATCTTGTTTTTTATGGCACT	+960
S E Y F I *	305
CATATACCGAATTC	+974

図4. ppe1+遺伝子の塩基配列と予想遺伝子産物のアミノ酸配列

遺伝子破壊に用いたEcoRI部位と抗体の調整のための融合タンパク作成に用いたSspI部位を示す。

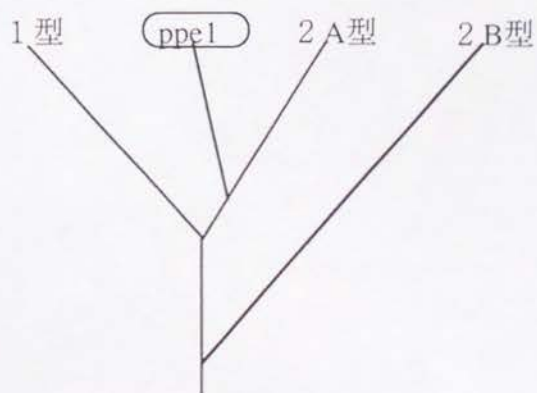
表2. ppe1と他のPPaseとのアミノ酸配列の比較

S.pombeのPPase

dis2	43.3% / 277 aa
sds21	44.4% / 286 aa
ppa1	54.8% / 303 aa
ppa2	54.1% / 303 aa
ppe2	59.9% / 307 aa
ppb1	40.8% / 282 aa

他の生物のPPase

SIT4	72.5% / 305 aa	S. cerevisiae
PPH3	58.3% / 309 aa	S. cerevisiae
PPX	61.7% / 303 aa	rabbit
PPV	67.5% / 305 aa	Drosophila





SIT4	MVSRGPDEWLETIKKCOALTENEMKOLCEMVKELLMEESNIQPVTQPTVTCGDIHGQFHDLLELFRTAGG	70
ppe1	MFDLDEWIAIVRKCKYLPEHOLKRLCEMVKVILMEESNIQPVRTPTVTCGDIHGQFYDLLELFRVGGG	68
ppa2	MSIDPANDSKLAPEANDATTGVDVRIEQLKCEPLSEADVEMLCDKAREVLCOENNVQEVNRPVTVCGDIHGQFHDLMELFKIGGD	87
dis2	MSNPVDVLDSDIRLLEVRGSRPGROVOLSEDIRFLCNKAREIFISOPILLELEAPLKICGDIHGQYDILLRLEFYGGF	80
	FPDDINYYIFLGDYVDRGYYSLETFTLLMCLKVKYPAKITLVRGNHESROI TOVYGFYEECLNKYGSTTVWKYCCOVDFLTLAAII	156
	LPS-TNYIFMGDFVDRGYFSLETFTLFMLLKARYPDKITLLRGNHESROI TOVYGFYDECOTKYGNANVWKYCCOVDFLTLAAVI	153
	VPD-MNYLFMGDYVDRGYHSHVETVSLLVAMKLRYPNRTITLRGNHESROI TOVYGFYDECLRKYGSANVWKHFTNLFQYFPLTALI	172
	PPE-ANYLELGDYVDRGKQSLVLCILLAYKIKYPENFFILRGNHECASINRIYGFYDECKRRY-NIKLWKTFDCENCLPIAAII	164
	DGKILCVHGGLSPEIRMLDQIRVLSRAQEVPHGGFSDLLWSDPD-NVEAWQVSPRGAGWLFSGKVAREFNGVNHNLIARAHQLV	241
	DNKILCVHGGLSPEVRTLDQIRILARAQEIIPHEGSFCDLMWSDPE-DIESWTVSPRGAGWLFSGKVTTTFESQINDTLIARAHQLV	238
	EDRIFCLHGSLSPSIDSLDGVRTLDRVQEVPHGPMCDLLWSDPD-DRCGWGISPRGAGYTFGQDISETFNHANGSLTARAHQLV	257
	DEKIFTMHGGLSPDLNSMDQIORIMRPTDVPDTGLLCDLLWSDPDKDLTGWGDNDRGVSFTFGPDVVSRLFHKHKMOLVCRAHQVV	250
	MEGFKYHFPEKDVVTVWSAPNYCYRCGNVASVMKVDEDELEPTFKIFSAPVDDYIRESTANHNQRAGYFL	311
	OEGYKYHFADKNLVTVWSAPNYCYRCGNVASVMKYPESELEFEFRIFSAAVEDRTVPPSRKRSE---YFI	305
	MEGYNWA-HDGDVVTIFSAPNYCYRCGNQAAILEVDDTMNQVLOEDPAPREGEPIARRTPD---YFL	322
	EDGYEFF-SKRQLVTLFSAPNYCGEFDWAGAMMSVDESLLCSEQILKPAEKKORYGYQGSSONWHMTPPRKNKTGNSK	327

図5. ppe1と他のフォスファターゼのアミノ酸配列の比較

出芽酵母SIT4、分裂酵母ppa2、dis2との比較を示した。ppe1と同一の残基に影をつけて示した。



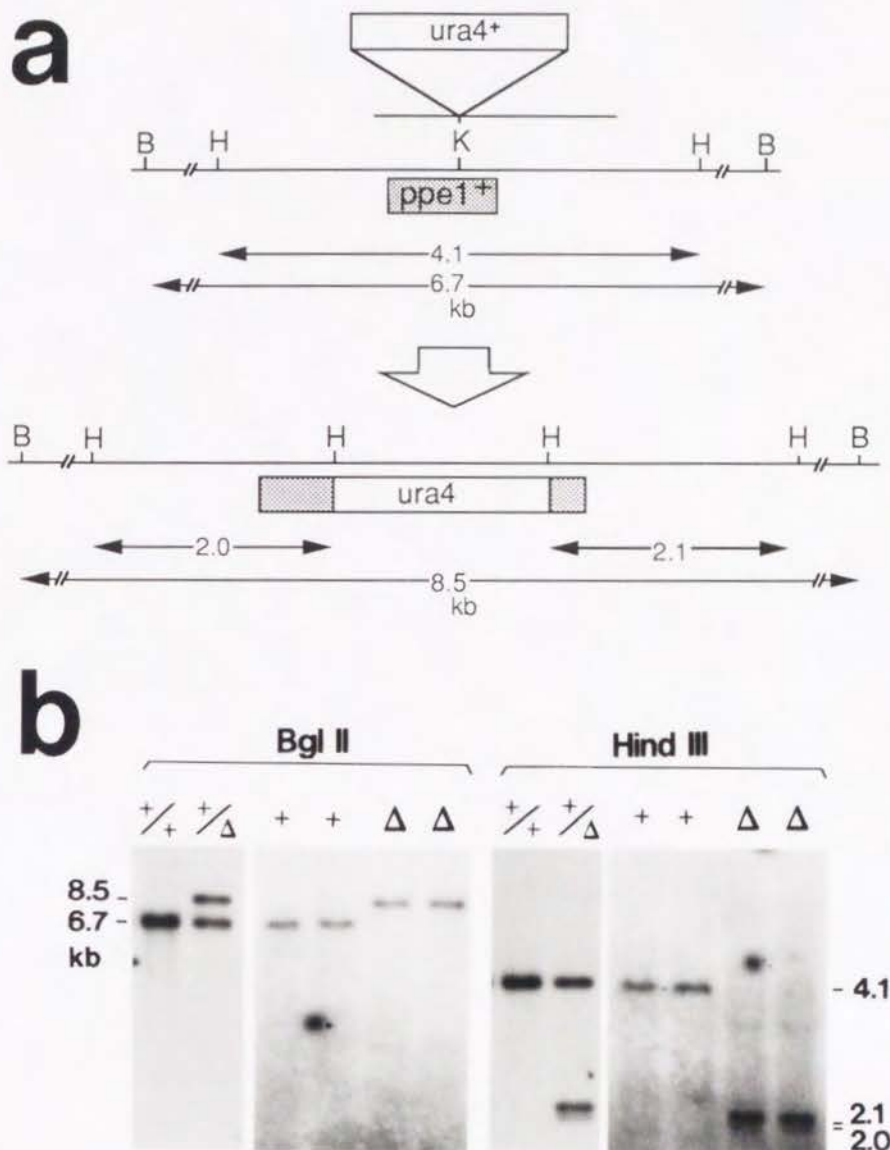


図6. *ppe1*<sup>+</sup>遺伝子破壊

(a)*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子破壊の構成

*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子中のKpnI部位にHindIIIリンカーを挿入し、*ura4*<sup>+</sup>遺伝子のHindIII断片を挿入した。ここから、8.5kbのBglII断片を切り出し、*S. pombe*二倍体細胞に導入した。

(b)*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子破壊の確認。

ゲノムDNAをBglIIおよびHindIII消化し、サザン法を行った。*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子を含む4.1kbのHindIII断片を<sup>32</sup>P標識し、プローブとして用いた。

+/+：野生型二倍体、

+/-：ゲノムの片方にのみ破壊された*ppe1*遺伝子を持つヘテロ二倍体、

+およびΔ：ヘテロ二倍体からの一倍体segregantsの一組、

+は野生型*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子、Δは破壊された*ppe1*遺伝子を持つことを表す。

ppe1+遺伝子が生育に必須でないことを示す。

しかし、一倍体のppe1+遺伝子破壊株 ( $\Delta$ ppe1) の生育は、正常ではなく、生存率は低下していた。YPD富栄養培地中、33℃で細胞数の二倍に増える時間は野生株では2.2時間であるが、 $\Delta$ ppe1では同じ培養条件で3.5時間であった。さらに、Matsumoto & Beach (1993)の記述にもあるが、 $\Delta$ ppe1の生育は低温感受性であった。26℃では小さなコロニーを形成し、20℃ではコロニーを形成しなかった (図7a)。ppe1+遺伝子を持った多コピープラスミドを導入すると、低温感受性の表現型が相補された (図8)。したがって、ppe1+遺伝子の欠損は低温感受性致死をもたらすと結論した。

$\Delta$ ppe1では細胞の長さと形が野生型細胞とは異なっており、短く、丸い形になっていた (図7b、図9)。 $\Delta$ ppe1の平均細胞長は、26℃で7.6  $\mu$ m、33℃で9.6  $\mu$ mであった。26℃で遅く増殖している $\Delta$ ppe1株の平均細胞長 (7.6  $\mu$ m) は、36℃でのwee1-50変異株 (Fantes 1981; Russell and Nurse 1986, 1987)の平均細胞長 (7.0  $\mu$ m) に近く、野生株の平均細胞長11.0  $\mu$ mよりもかなり短い。しかし、 $\Delta$ ppe1変異株では、細胞の太さがwee1-50変異株の場合の約1.5倍になっているという点で、wee1-50とは異なっている (図7b)。 $\Delta$ ppe1では、細胞が丸くなっていたり、洋梨型になっていたり、あるいはもっと異常な形態となっていたりする。wee1-50変異株では、野生株と同じように、桿型の細胞である。

DAPI染色した細胞が、図7bに示してある。過凝縮した染色体も異常に分配された染色体も観察されなかった。 $\Delta$ ppe1株の有糸分裂途中の細胞の割合は26℃での割合は野生株と同等であった。したがって、 $\Delta$ ppe1において、有糸分裂における目立った異常は何も見られなかった。

$\Delta$ ppe1細胞の33℃、26℃、20℃におけるDNA含量をFACScan法によって解析した。図7cに示すように、33℃で対数増殖期にある $\Delta$ ppe1の細胞のDNA含量ピークが1つであった。このピークの位置は、同条件での野生型細胞の示すG2期のDNA含量のピークから、G1期のDNA含量のピーク位置の反対側にずれていた。G1期の細胞のDNA含量のピーク位置は、窒素源枯渇させた野生型細胞や36℃の制限温度下においたcdc10変異株によって決めた。このずれは、おそらく、細胞の形や長さの変化によるものだと考えられる。したがって、許容温度下での $\Delta$ ppe1の細胞はほとんどG2期のDNA含量であると考えられる。26℃で増殖の遅くなった細胞も、20℃で増殖を停止した細胞もFACScan法の結果

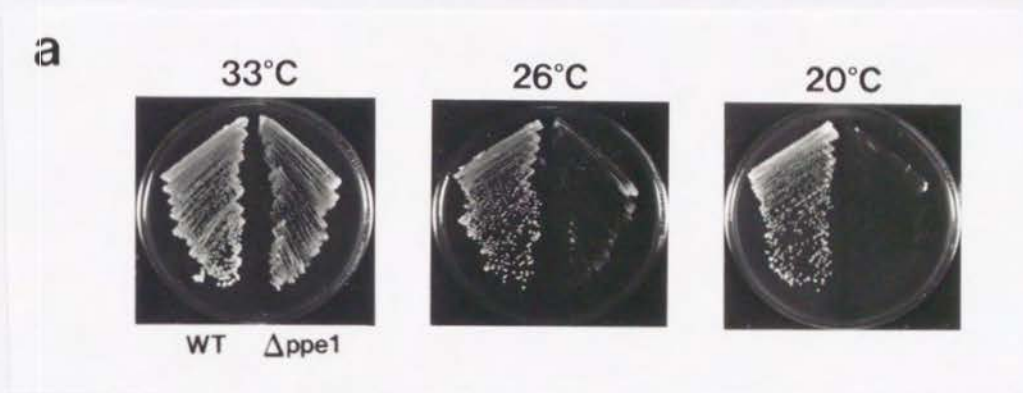


図7. ppe1+遺伝子破壊株の表現型

(a)低温感受性

wt: 野生株,  $\Delta ppe1$ : ppe1+遺伝子破壊株

YPD寒天培地にストリークし、33°C、26°C、20°Cでそれぞれ4日間、培養した。ppe1遺伝子破壊株は、20°Cではコロニーを形成できない。

(b)細胞形態と核形態

33°C、YPD中で対数的に増殖している野生株、ppa2+遺伝子破壊株、wee1-50変異株、ppe1+遺伝子破壊株のそれぞれをDAPI染色し、蛍光顕微鏡で観察した。ppe1+遺伝子破壊株では、細胞が丸く変形していた。核形態には異常は見られなかった。図右下のバーは10  $\mu$ m。

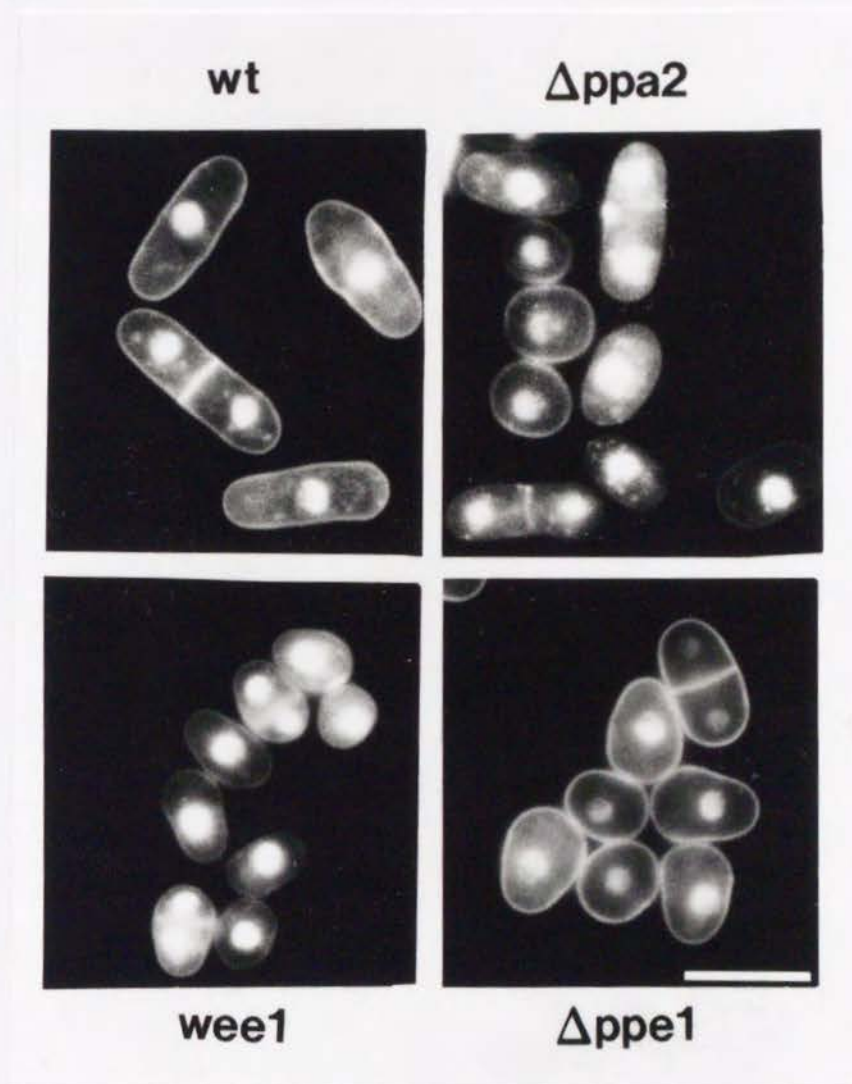
(c)細胞のDNA含量

33°C、YPD中で対数的に増殖している野生株とppe1+遺伝子破壊株のDNA含量をFACSscan法で測定した。

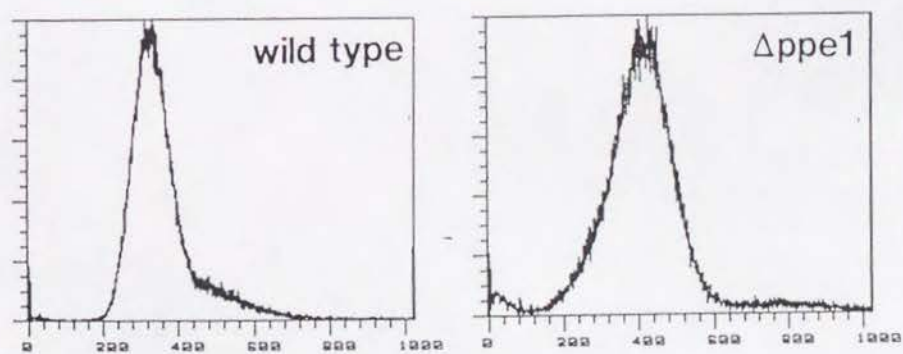
次頁に続く



b



c



は同様であった。

また、*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子破壊株は、異なる接合型の野生株と掛け合わせても、接合体を形成せず、接合不能となっていた。

### △*ppe1*の低温感受性表現型の多コピーサプレッサー

様々のフォスファターゼ、キナーゼおよび関連の遺伝子について△*ppe1*の低温感受性を相補できるかどうか試験した。図8と表3で示すとおり、分裂酵母の以下4つの遺伝子が多コピー導入によって低温感受性を抑制できることがわかった。これらは、26℃および20℃でコロニーを形成することができた。フォスファターゼ遺伝子*ppa1*<sup>+</sup>および*ppa2*<sup>+</sup>は(Kinoshita et al., 1990)、多コピープラスミドによって導入すると、△*ppe1*の生育阻害の表現型を抑制できた。この2つの遺伝子産物のアミノ酸配列は約80%相同である。フォスファターゼ遺伝子*dis2*<sup>+</sup>遺伝子と*sds21*<sup>+</sup>遺伝子(Ohkura et al., 1989)、および*dis2*<sup>+</sup>と*sds21*<sup>+</sup>の制御因子である*sds22*<sup>+</sup>遺伝子は(Ohkura et al., 1991; Stone et al., 1993)、それぞれ△*ppe1*の低温感受性を抑制できなかった。

*dis3*<sup>+</sup>遺伝子を多コピープラスミドで導入した△*ppe1*株もまた、20℃でコロニー形成できるようになる(図8)。したがって、*dis3*<sup>+</sup>遺伝子もコピー数の増加によって△*ppe1*の低温感受性致死を抑制できる。このことは、*S. cerevisiae*において、SSD1遺伝子の過剰発現により*sit4*変異の表現型が抑制されることとよく似ている。*dis3*<sup>+</sup>遺伝子産物の予想アミノ酸配列は、SSD1/SRK1の配列(Sutton et al., 1991; Wilson et al., 1991)と類似性があることが示されている(Kinoshita et al., 1991b)。*dis3*<sup>+</sup>遺伝子は、フォスファターゼ遺伝子*dis2*<sup>+</sup>と密接な関係にあることが報告されている。*dis2-11*と*dis3-54*はそれぞれ低温感受性で、その表現型は非常によく似ている。また*dis2-11 dis3-54*の二重変異株は、非制限温度下でも致死となる。

驚いたことに、プロテインキナーゼC関連遺伝子*pck1*<sup>+</sup>(Toda et al., 1993)を持つ多コピープラスミドが△*ppe1*を相補することがわかった(図8)。プロテインキナーゼ*pck1*と*pck2*は哺乳類のプロテインキナーゼCのコンセンサス配列を持っており、また、*pck2*<sup>+</sup>遺伝子の欠損変異株は、△*ppe1*と似通った細胞形態異常の表現型を示す。

これらの多コピーサプレッサーは、3種に分類される。すなわち、フォスファターゼ、キナーゼ、有糸分裂に必須なフォスファターゼ関連蛋白質である。これらの遺伝子

表 3. ppe1+遺伝子破壊株の低温感受性の抑制

遺伝子	コロニー形成	
	(20℃)	(33℃)
ppe1+	+++	+++
vectorのみ	-	++
ppa1+	+	++
ppa2+	+	++
dis2+	-	++
sds21+	-	++
sds22+	-	++
dis3+	+	++
pck1+	+	++
SIT4( <i>S. cerevisiae</i> )	++	+++
SSD1( <i>S. cerevisiae</i> )	-	++

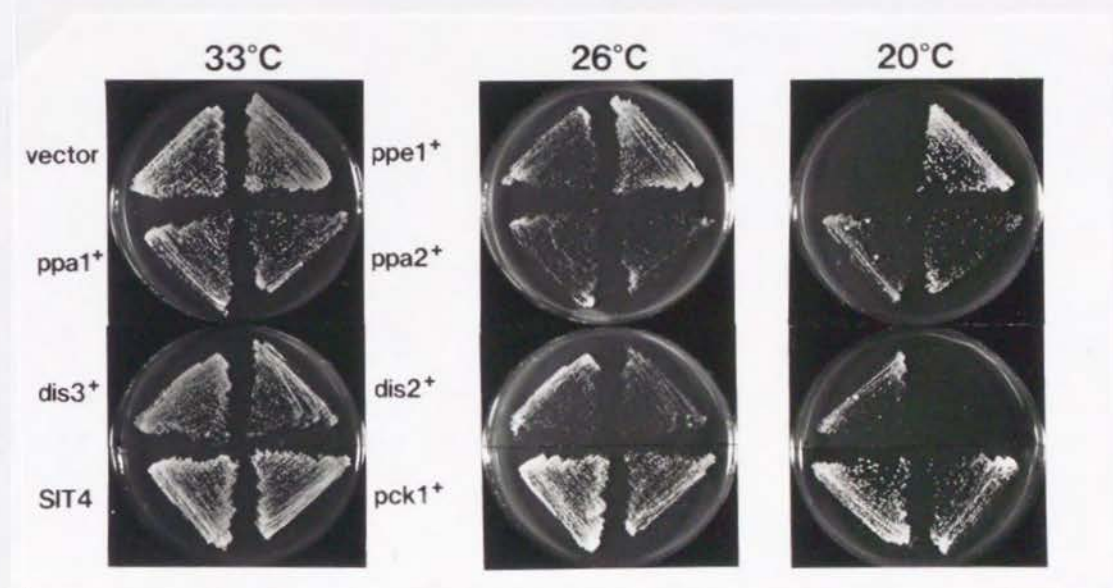


図8. 多コピーサプレッサーによる  
*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子破壊株の低温感受性の抑制

それぞれの遺伝子を含む多コピープラスミドを *ppe1*<sup>+</sup> 遺伝子破壊株に導入し、EMM2寒天培地にストリークした。それぞれ、33°Cで4日間、26°Cで6日間、20°Cで10日間、培養した。



ppa1<sup>+</sup>、ppa2<sup>+</sup>、dis3<sup>+</sup>、pck1<sup>+</sup>による $\Delta$ ppe1の表現型の抑制は、ppe1<sup>+</sup>遺伝子自身によるものより不完全であり、20℃や26℃でのコロニーの大きさは、野生株やppe1<sup>+</sup>遺伝子を含む多コピープラスミドを持つ $\Delta$ ppe1株に比較して小さい。

#### 出芽酵母のSIT4遺伝子も多コピーサプレッサーである

*S. cerevisiae*のSIT4遺伝子(Arndt et al., 1989) (K. Arndt博士より供与) を含む多コピープラスミドは、 $\Delta$ ppe1の低温感受性表現型を抑制した(図8、表3)。形成されたコロニーの大きさから判断すると抑制の程度は不完全であったが、他の多コピーサプレッサーと比較すると、この抑制は、20℃でも26℃でも顕著であった。このことと、ppe1とdis3、SIT4とSSD1/SRK1の関係が似ていることを考えあわせると、SIT4とppe1は、機能的ホモログの関係にあるといえよう。出芽酵母のSSD1/SRK1遺伝子(Sutton et al., 1991; Wilson et al., 1991) (K. Tatchell博士より供与) は $\Delta$ ppe1の低温感受性を抑制できなかった(表3)。しかし、SSD1/SRK1遺伝子がこの条件下で*S. pombe*において発現しているかどうか確認していない。

#### 多コピーサプレッサーによる細胞形態異常の抑制

低温感受性の多コピーサプレッサー遺伝子が細胞形態異常の表現型も抑制できるかどうか調べた。図9に、多コピープラスミドベクターおよびそれぞれppe1<sup>+</sup>遺伝子、出芽酵母SIT4遺伝子、ppa2<sup>+</sup>遺伝子、pck1<sup>+</sup>遺伝子、dis3<sup>+</sup>遺伝子を含む多コピープラスミドを持った $\Delta$ ppe1の形質転換体を示した。ベクターを持つ $\Delta$ ppe1の細胞は短く洋梨型をしているが、ppe1<sup>+</sup>遺伝子自身を持つ細胞は、形も長さも正常であった。細胞の大きさの分布も野生株の場合と同様であった。SIT4遺伝子、ppa2<sup>+</sup>遺伝子、pck1<sup>+</sup>遺伝子、dis3<sup>+</sup>遺伝子を持つプラスミドによる $\Delta$ ppe1の形質転換体は、いずれも、それぞれ短い細胞や洋梨型の細胞を含んではいるが、大半はほとんど正常な形態の細胞であった。SIT4遺伝子の多コピー導入は、細胞の長さと形態に大きな効果を及ぼし、 $\Delta$ ppe1の細胞形態をほとんど正常に戻したが、わずかに丸い細胞も含まれていた。3つの遺伝子、ppa2<sup>+</sup>、pck1<sup>+</sup>、dis3<sup>+</sup>は、不完全な抑制パターンを示し、 $\Delta$ ppe1の細胞形態の異常は3つのどの形質転換体においても一部に残存した。

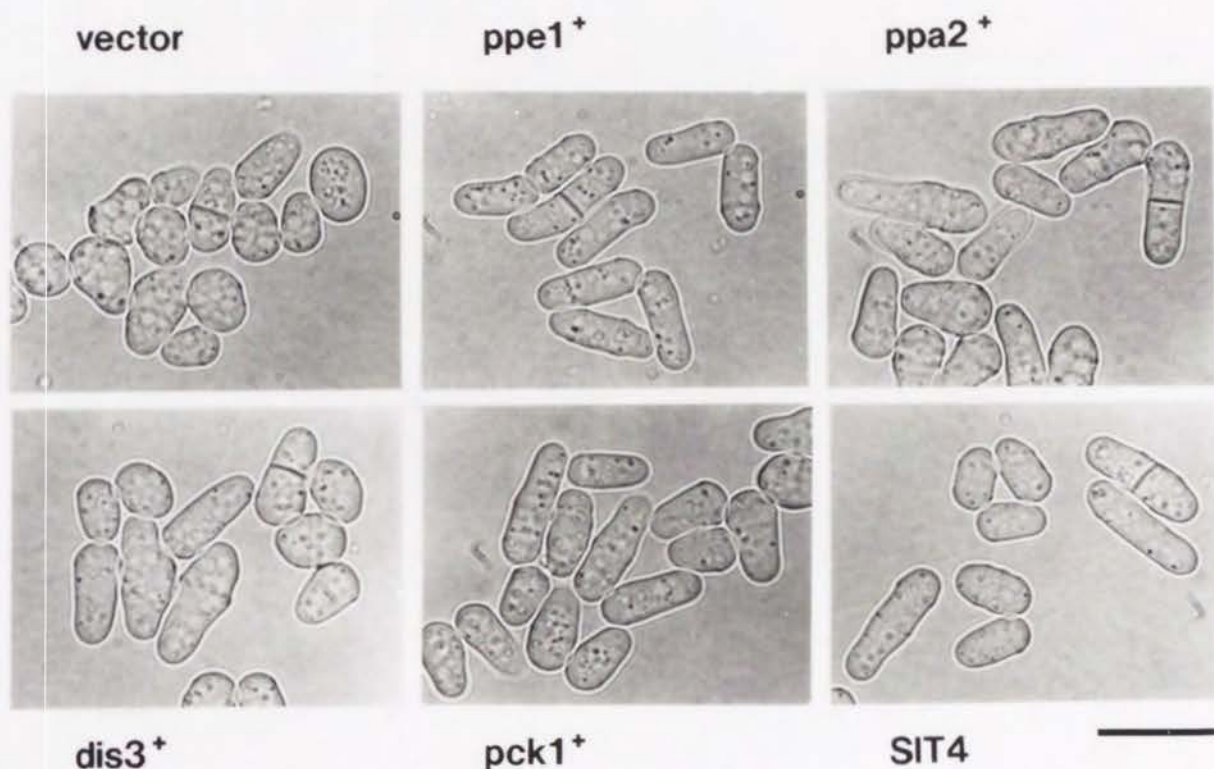


図9. 多コピーサプレッサーによる  
*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子破壊株の細胞形態異常の抑制

*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子破壊株にそれぞれの遺伝子を導入した株をEMM2液体培地中33℃で培養し、位相差顕微鏡で観察した。図右下のバーは10  $\mu$ m。pDB248ベクターのみを導入したものでは、丸い異常な細胞形態であるが、*ppe1*<sup>+</sup>遺伝子を導入したものは、細胞形態が正常の棒型に戻っている。*ppa2*<sup>+</sup>遺伝子、*dis3*<sup>+</sup>遺伝子、*pck1*<sup>+</sup>遺伝子、*SIT4*遺伝子、それぞれの多コピー導入によって、完全ではないものの、細胞形態が棒型に戻っている。



## ppe1+遺伝子と必須機能を共有する遺伝子

ppe1+遺伝子破壊株を、他のフォスファターゼ遺伝子ppa1+、ppa2+、dis2+、sds21+、それぞれの遺伝子破壊株と掛け合わせてできた二重変異株について、生育能を調べた。 $\Delta ppe1$ は接合能が低下していて、窒素源を含まないSPA培地上で、異なる接合型の野生株と掛け合わせてもほとんど接合体を形成しないので、ppe1+遺伝子を持つプラスミドで形質転換したものを掛け合わせに用いた。その後、四分子解析を行ない、プラスミドを欠落した一倍体株を解析した。表4に示すように、 $\Delta ppe1 \Delta ppa2$ 二重変異株は、コロニー形成ができなかった。このことは、ppe1+遺伝子とppa2+遺伝子が、ある必須機能を共有することを示唆している。他の二重変異株、 $\Delta ppe1 \Delta ppa1$ 、 $\Delta ppe1 \Delta dis2$ 、 $\Delta ppe1 \Delta sds21$ は、それぞれ生育可能でコロニーを形成した。しかし、そのうち二つの株 $\Delta ppe1 \Delta ppe1$ と $\Delta ppe1 \Delta ppe1$ は、 $\Delta ppe1$ 単独変異株のように生育せず、二倍増殖時間は、 $\Delta ppe1$ 単独変異株と $\Delta ppe1 \Delta ppe1$ 二重変異株がでは3.5時間であるのに対して、5.2時間であった。 $\Delta ppe1 \Delta ppa2$ の二重変異株の胞子は発芽できるが、細胞分裂は数回しか起こらずに停止する。これらの停止した細胞の形態は、 $\Delta ppe1$ 単独変異株と類似していた。

$\Delta ppe1$ と $\Delta pck1$ の間でも二重変異株は致死となった。したがって、ppe1フォスファターゼとpck1キナーゼも必須機能を共有しているかもしれない。ppe1+遺伝子とpck1+遺伝子の機能的関連は、表5に示したように、 $\Delta ppe1$ のスタウロsporin感受性によって、さらに強調される。野生型の分裂酵母は、プロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロsporinに対して感受性であり、濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の薬剤存在下では生育できない。 $\Delta ppe1$ は野生株よりさらにこの薬剤に対して超感受性となる（濃度 $0.3 \mu\text{g/ml}$ で生育できない）。ppe1+遺伝子やpck1+遺伝子の多コピー導入によってスタウロsporin超感受性は抑制される。ppe1+遺伝子の欠損は、スタウロsporin感受性を決定するキナーゼの活性または量を低下させるかもしれない。

## ppe1+遺伝子産物の同定

遺伝子産物を同定するため、T7プロモーターを用いて大腸菌で産生させたppe1の全長のポリペプチドに対して、抗血清を調製した。図10に示したように、野生株の細胞抽出

表4. 二重変異の表現型

	コロニー形成 (33°C)	世代時間
wild type	+++	2.2
$\Delta ppe1$	++	3.5
$\Delta ppe1 \Delta ppa1$	+	5.2
$\Delta ppe1 \Delta ppa2$	-	-
$\Delta ppe1 \Delta dis2$	+	5.2
$\Delta ppe1 \Delta sds21$	++	3.5
$\Delta ppe1 \Delta pck1$	-	-

表5. スタウロスポリン感受性

	スタウロスポリン ( $\mu$ g/ml)		
	0.2	0.3	0.5
wild type	+	+	-
$\Delta$ ppe1	+	-	-
$\Delta$ ppe1/p(ppe1+)	+	+	-
$\Delta$ ppe1/p(pck1+)	+	+	-

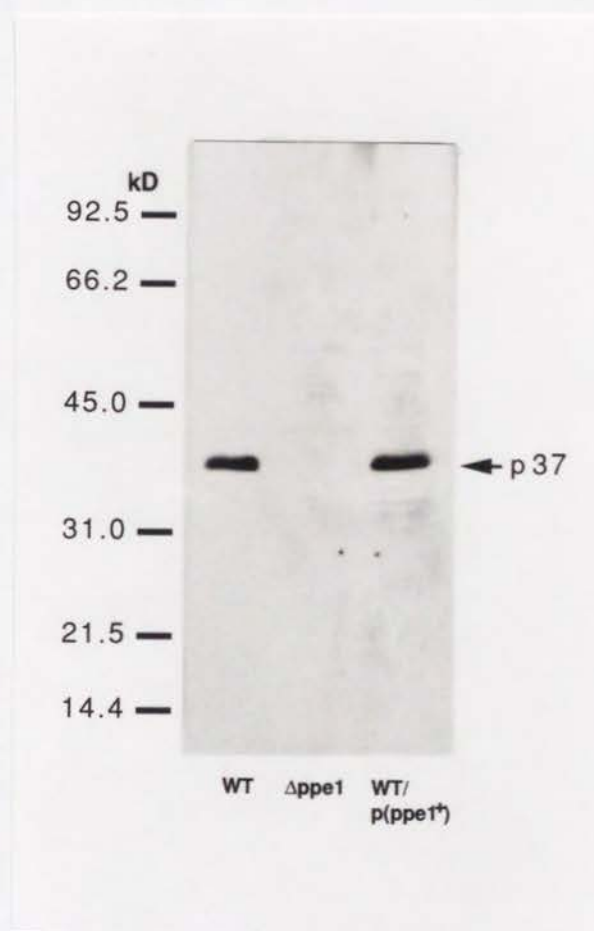


図10. ppe1<sup>+</sup>遺伝子産物の同定

野生株、ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株、ppe1<sup>+</sup>遺伝子多コピー導入株、それぞれの細胞抽出液を15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、抗ppe1抗体を用いてイムノブロット法を行った。分子量マーカーとして、フォスフォリラーゼB (92.5kd)、ウシ血清アルブミン (66.2kd)、オブアルブミン (45.0)、アンヒドラーゼ (31.0kd)、ダイズトリプシンインヒビター (21.5kd)、リゾチーム (14.4kd) を用いた。約37kdのppe1<sup>+</sup>遺伝子産物が同定された。



液中から37kdのバンドが検出され、それは $\Delta ppe1$ では完全に消失していた。また、 $ppe1^+$ 遺伝子を含む多コピープラスミドをもった株では、バンドの濃さが、わずかに濃くなっていた。したがって、この抗体は、 $ppe1^+$ 遺伝子産物を特異的に認識すると結論した。

### $ppe1$ と直接相互作用する蛋白質

プロテインA-セファロースビーズと結合させた抗 $ppe1$ 抗体を用いて、免疫沈降法をおこなった。免疫沈降後、SDS-PAGEを行い、クーマシーブルー染色と、銀染色を行った。図11に示したように、野生株の細胞抽出液からは、 $ppe1$ 蛋白質自身の分子量37kdのバンドに加えて、分子量約130kdのバンドが検出された。ところが、 $ppe1^+$ 遺伝子破壊株の抽出液からは、37kdのバンドのみならず、この130kdのバンドも検出されなかった。したがって、この130kdのポリペプチドは、 $ppe1$ 蛋白質と特異的に相互作用すると考えられる。このポリペプチドを回収し、アミノ酸配列決定を試みたが、N末端がブロックされていたため、結果は得られなかった。

### $ppe1^+$ 遺伝子過剰発現の細胞分裂における効果

分裂酵母の誘導可能なプロモーターである $nmt1$ (Maundrell 1990)を $ppe1^+$ 遺伝子の過剰発現に用いた。 $ppe1^+$ 遺伝子の開始コドンの上流に $nmt1$ プロモーターをつないだプラスミドを野生株に導入した。 $nmt1$ プロモーターは、チアミンの存在下で遮断され、チアミンの非存在下で誘導される。 $nmt-ppe1^+$ 遺伝子を持った野生株は、寒天培地上でチアミンの存在、非存在によらず、コロニーを形成する。コロニーの大きさは、チアミン非存在下では、チアミン存在下に比べて小さくなっていた。

液体培地では、細胞内のチアミンが消費され尽くすまでに数回の分裂を要するため発現誘導は10時間を過ぎて初めて観察される。イムノブロット法で検出した $ppe1$ 蛋白質の量は、12時間から増える(図12a)。たくさんの分解産物も同定された。DAPI染色して蛍光顕微鏡で観察すると、わずかに異常な核も観察されたが、さほど顕著な異常はなかった(図12b)。細胞の平均長は10%程度伸びていた。抗チューブリン抗体による染色では、大部分の細胞が、正常な細胞質微小管を持っていた(図12c)。



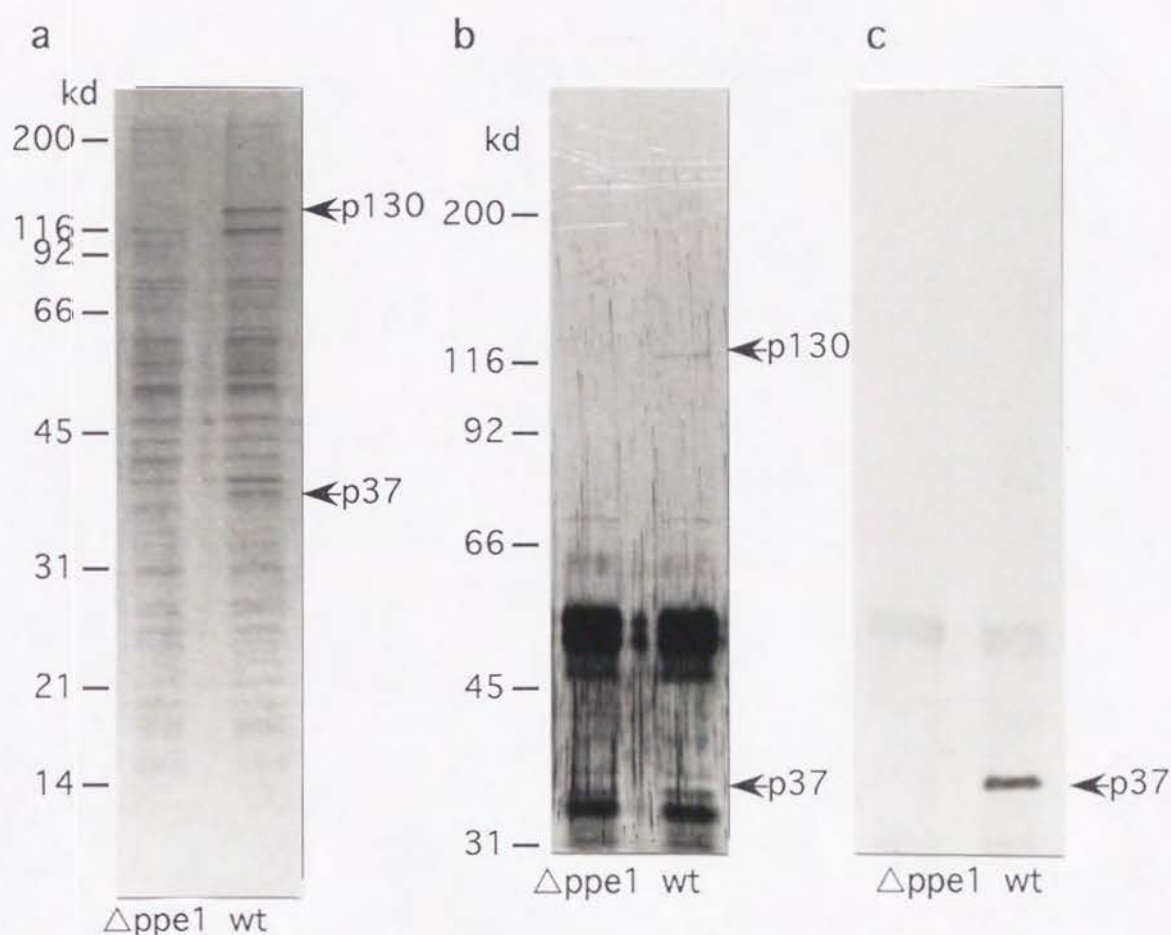


図11. 抗*ppe1*抗体による免疫沈降法

抗*ppe1*抗血清と結合させたプロテインAセファロースビーズを用いて、野生株および *ppe1*+遺伝子破壊株の細胞抽出液に対して免疫沈降法を行った。SDS-PAGEの後、クーマシーブルー染色 (a)、銀染色 (b) を行った。また、イムノプロット法で *ppe1*+遺伝子産物を検出した (c)。分子量マーカーとして、ミオシン (200.0kd)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116.2kd)、フォスフォリラーゼB (92.5kd)、ウシ血清アルブミン (66.2kd)、オブアルブミン (45.0)、アンヒドラーゼ (31.0kd)、ダイズトリプシンインヒビター (21.5kd)、リゾチム (14.4kd) を用いた。分子量約37kdの *ppe1*+遺伝子産物のバンドとともに、約130kdのバンドが特異的に検出された。

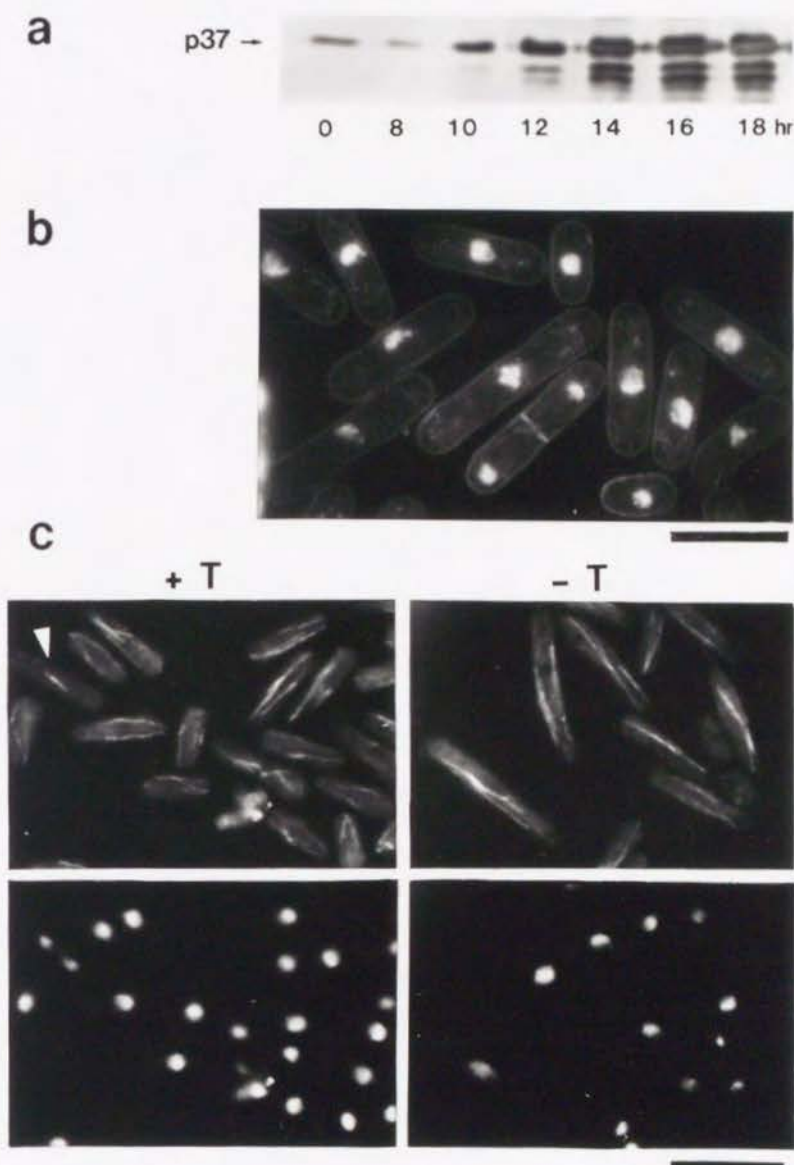


図12. ppe1+遺伝子過剰発現の効果

(a)過剰産生したppe1+遺伝子産物の検出

nmt1プロモーターの下流にppe1+遺伝子をつないだ多コピープラスミドpXP102を野生株に導入した。チアミンを含まない培地に移して10時間後から2時間おきにサンプリングし、抗ppe1抗体を用いたイムノプロット法により、ppe1+遺伝子産物の量を調べた。

(b)核形態の観察

チアミンを含まない培地に移してから16時間培養した細胞をDAPI染色して、蛍光顕微鏡で観察した。図右下のバーは10 $\mu$ m。

(c)微小管の観察

ppe1+遺伝子を過剰発現した細胞を、抗チューブリン抗体TAT1とDAPIで染色した。図右下のバーは10 $\mu$ m。 +T: チアミンの存在する培地で培養した細胞（白い三角印は、スピンドルを持った有糸分裂期の細胞を示す。）。 -T: チアミンを含まない培地に移して16時間培養した細胞

### ppe1<sup>+</sup>遺伝子産物の細胞内局在

抗ppe1抗体を用いて間接蛍光抗体法による染色を行った(図13)。野生株では、細胞質が薄く染まり、核の抜けた像が観察された。ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株では、全体に染色は薄いものの、やはり、核が抜けて見えた。nmtプロモーターによるppe1<sup>+</sup>遺伝子高発現株では、細胞質が濃く染色され、核の抜けて見える細胞が観察された。野生型細胞におけるppe1<sup>+</sup>遺伝子産物の局在については、確定的な結果ではなかった。

### ppe1<sup>+</sup>遺伝子の染色体上の位置

ppe1<sup>+</sup>遺伝子の全長を含むDNA断片をプローブとして、コスミドベクターを用いた分裂酵母ゲノムライブラリーに対してサザンハイブリダイゼーションを行った。このライブラリーについて、それぞれのコスミドクローンに含まれるゲノム断片どうしの相対的な位置関係と、染色体上のマッピングが進められている。(Mizukami et al., 1993)ハイブリダイゼーションの結果、5つのクローンから強いシグナルが検出され、さらに5つのクローンから弱いシグナルが検出された。これらは、それぞれでcontigを形成していた。他の既知の遺伝子断片をプローブとするサザンハイブリダイゼーションの結果から、強いシグナルのグループは、第三染色体の長腕部に位置することがわかった(図14)。また、弱いシグナルのグループは、後述する解析により、新しいフォスファターゼ遺伝子、ppe2<sup>+</sup>を含むことがわかった。

### 新しいフォスファターゼ遺伝子ppe2<sup>+</sup>

ppe1<sup>+</sup>遺伝子の全長を含むプローブを用いたハイブリダイゼーションで、強いシグナルが検出されたコスミドが5つ、弱いシグナルが検出されたコスミドが5つ見つかった。これらは、それぞれ5つずつcontigを形成しており、強いシグナルのグループは第三染色体上にあってppe1<sup>+</sup>を含んでおり、弱いシグナルのグループは第二染色体上のdis3<sup>+</sup>およびnda3<sup>+</sup>の近傍に位置していた。これらのコスミドから、ppe1<sup>+</sup>のプローブを用いてサ



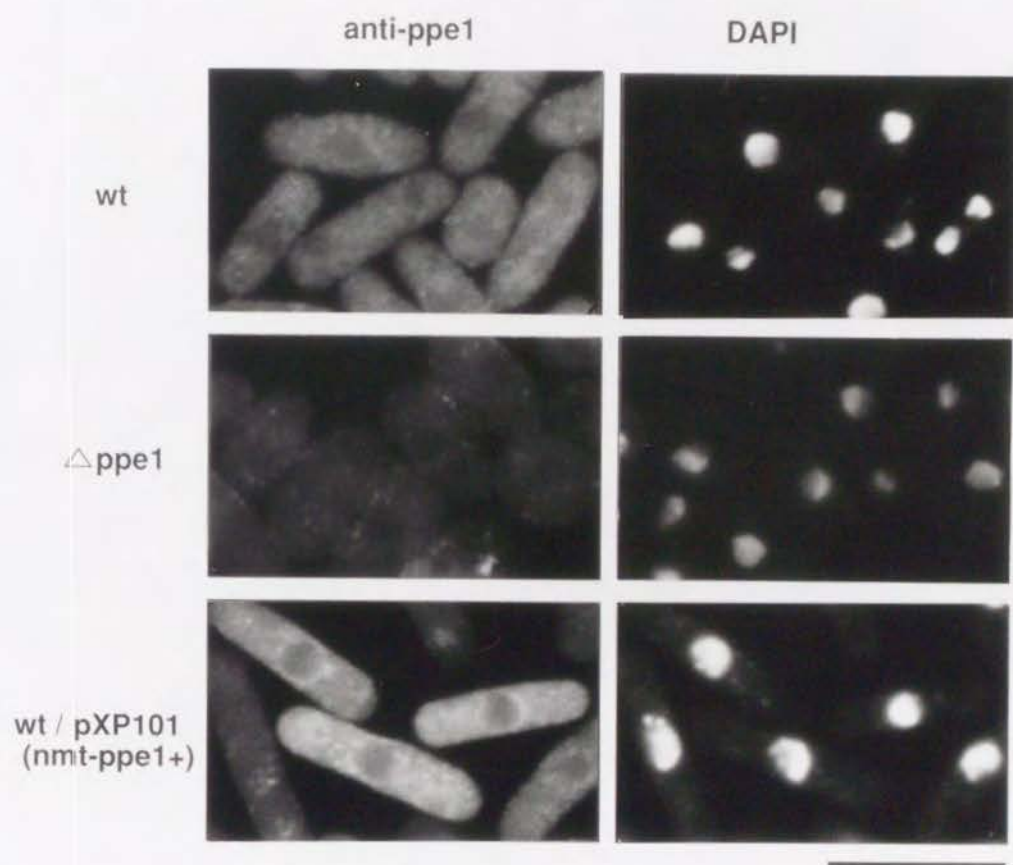


図13. ppe1+遺伝子産物の細胞内局在

YPD液体培地で対数的に増殖させた野生株、ppe1+遺伝子破壊株、ppe1+過剰発現株（野生株にpXP101を導入したもの、チアミンを含まないEMM2液体培地で16時間培養）を、グルタルアルデヒド・ホルムアルデヒド固定し、抗ppe1抗体で染色した。図右下のバーは10  $\mu$ m。

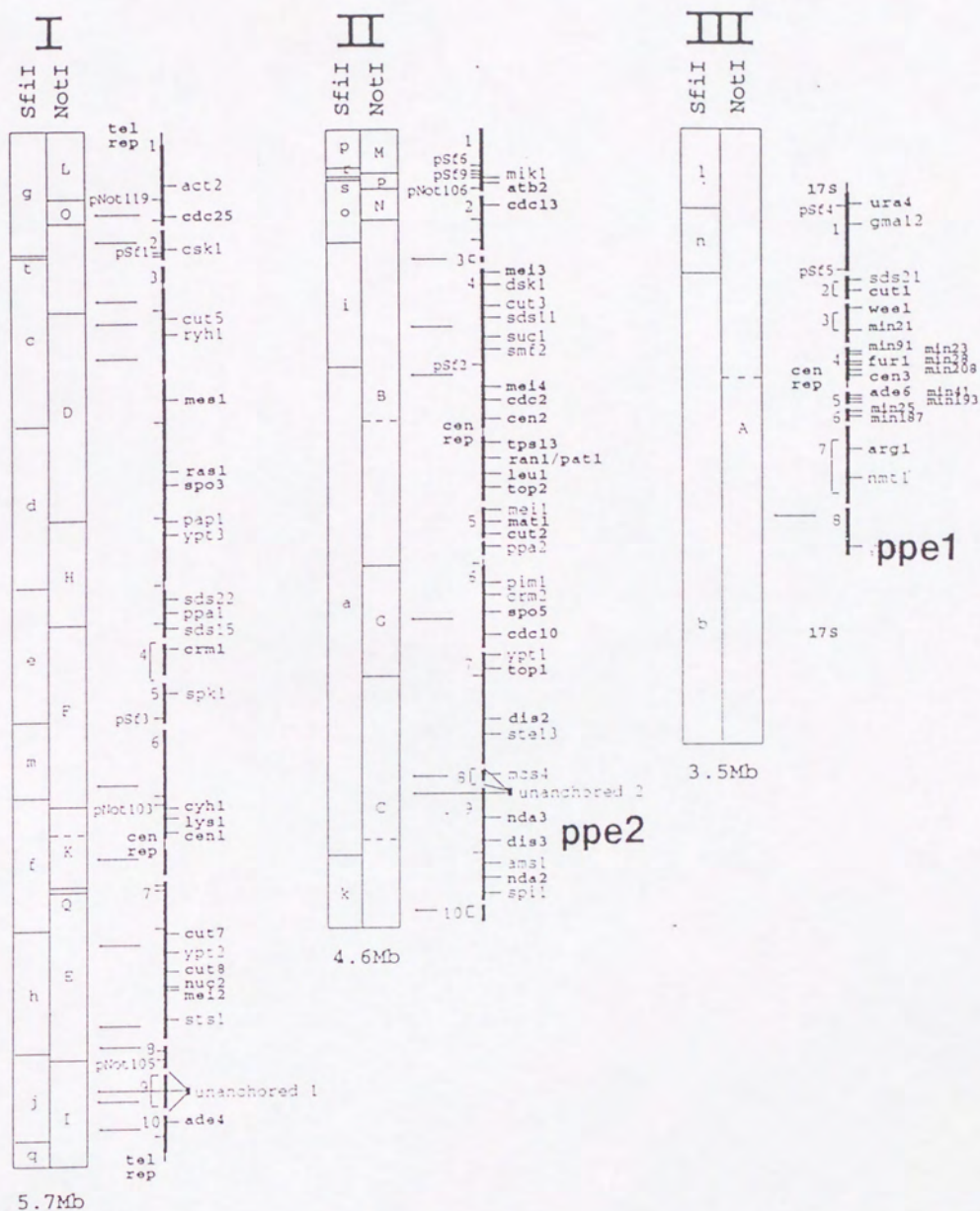


図14. ppe1+遺伝子とppe2+遺伝子の染色体地図上の位置

分裂酵母ゲノムのコスミドライブラリーに対するハイブリダイゼーションによる方法で決定されたppe1+遺伝子とppe2+遺伝子の位置を示す。

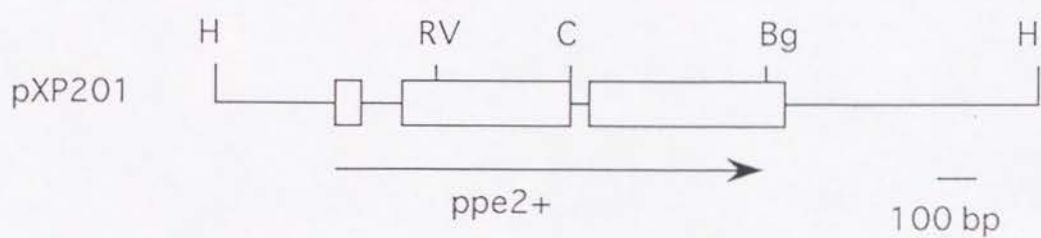


図15. pXP201の制限酵素地図

pXP201中に含まれる分裂酵母ゲノム断片の制限酵素地図を示す。ppe2+遺伝子のコード領域を四角で表した。ppe2+遺伝子には二つのイントロンが存在する。矢印はppe2+遺伝子の向きを示す。

H: HindIII, Bg: BglII,



TGA AAAA CAATCTAGCGTAACGCAACGTATGTGTCAATAAAATTCGGAAGCTGCTAATTAAGGAGGTCATGTTAATTATTTTAAAG -201  
 TCATTATCAAAAGGAAAACCGAATTTTAGTCACCAAGCTCTACGCGTCATACCTCTTGACAGAGGATTTTGACTTATTTAAATTTCTTAAAT -101  
 GAGTACATAAAGTTGAAAAGAATTTCACTTGTTATTTCTTATTCTAAAGGACCAAGTTATTCTAGTTTTCTTTACTTTATGTTTTGACGAGTTCAAA -1  
 ATGACTGATTTAGATTTGGATTGGCACTTGAGGAACGGAGAACGGAAGGTTAATTCAGAATCAATGGTATGTATAATAGTATTTATAGAATAACTT +100  
 M T D L D L D W Q L E E L E N G R L I P E S N 23  
 TTATCTCCGTCGATATAACAACGATCATTCAATTGTTGTTCTTTGCCATAATTATAAGAATGGGGTCTAACGTTTTGTGGTAGTTGTTGAACTTTGTC +200  
 V V E L C Q 29  
 AGCGTGAAGAGATATTTTAATTGAGGAATCTAACATACAATGGATCTCATCTCCTGTAACCATTTGTGGTGATATCCATGGCCAATTGCATGATTTACT +300  
 R V R D I L I E E S N I Q W I S S P V T I C G D I H G Q L H D L L 62  
 GGAGCTTTTTCGAATTGGTGGGTCATGTCCAGGTACAAAATATTTATTTCTAGGGGATTTTGTGATAGAGGGTTTTACTCTGTAGAAACATTTCTCTCG +400  
 E L F R I G G S C P G T K Y L F L G D F V D R G F Y S V E T F L L 95  
 TTATTGACTTTTAAATGTAATATCCGAAAGAGATGACCCTTATCCGGGGAATCATGAATCACGACAAATAACACAAGTTTATGGATTTTATGACGAAT +500  
 L L T L K C K Y P K E M T L I R G N H E S R Q I T Q V Y G F Y D E C 129  
 GTGTAAGGAAATATGGTCTGCCAATGTATGGCGATATTGTTGTGAAATATTTGATTATCTTTGCTTGGTGCTTTGGTGGATGGAAGGTTTTTGTGT +600  
 V R K Y G S A N V W R Y C C E I F D Y L S L G A L V D G K V F C V 162  
 GCACGGTGGACTTTTACCAAGCATCAGCAGTATCGATCAGGTATGTTATTAATTCGAAAATTTGAACATAACTTTTAAACGCTTTTATGAAGATTTCGAC +700  
 H G G L S P S I S S I D Q I R L 178  
 TGTGGATCGAAAACAAGATTCCGCATGAAGGAGCAATGTGTGATCTACTTTGGTCAGATCCAGAAGATATTAGTGGATGGGGTTTATCTCCAGAGG +800  
 L D R K Q E V P H E G A M C D L L W S D P E D I S G W G L S P R G 211  
 TGCTGGATTTTTGTTTGGTGCCGACGTTTCTGAAGTTTTTAATCGCGCTAATGACCTTTTCATTGCTGCTGCTCATCAATTGGTTATGGAGGGTTAC +900  
 A G F L F G A D V S E V F N R A N D L S F I A R A H Q L V M E G Y 244  
 AAAATCCATTTTTCCGATAAAGATAAACAGTATCCCAAATTTACAAATGAAGAGGACTCTGAGCTGGATTGAGATTCTGCCTCACCTGTTGATGATTCTC +1000  
 K I H F S D K D K Q Y P K F T N E E D S E L D S D S A S P V D D S P 278  
 CGGCACCTGGAGACATAATAACCATTCAGAAAAGGATAAAGGAAGCGTGGTACTGTTTGGAGTGCACCAATTACTGTTACAGATGTGGAATGTTGC +1100  
 A P G D I I T I P E K D K G S V V T V W S A P N Y C Y R C G N V A 311  
 TTCTATATTACAACCTTGATGAAAACCAAACGCAATCCTTTAAGATTTTTGGTACTGCCTCTCAAGAAAGATCTGGCATTCCAACAAAACGACCCATTGCC +1200  
 S I L Q L D E N Q T Q S F K I F G T A S Q E R S G I P T K R P I A 344  
 GACTACTTTTATGATTATTCAAAATTCATTGCTCTACTTCACTTCCCAATATCATGTATATAGGTCAACTTGTACTAAAGATTATCCCTTAACTCTT +1300  
 D Y F L \* 348  
 CTTATTGGTCTCTCATTTTTAATTCTGCACCTATTTAATCTTGTATGGAATTTGGTTATTTTAGCAATATTGATTTGTTTAGGACATCATAAATTTA +1400  
 AAAAGTAATTAAGTTAAATTTAATTGTAACTTTTTAAGCTAACTTCAACGCACAAGATTGTTTAGTCGCTTCTGAAGGTAATTTAAAGTAGATTGC +1500  
 AAAATGCTCGGTTTTCAACATTAAATCTGATTTGATCGG

図16. ppe2+遺伝子の塩基配列と予想遺伝子産物のアミノ酸配列

二カ所にイントロンが存在する。遺伝子破壊に用いたEcoRV部位を示す。

表6. 他のPPaseとのアミノ酸配列の比較  
(挿入配列を除いて比較)

S.pombeのPPase

dis2	44.6% / 276 aa
sds21	44.5% / 274 aa
ppa1	56.4% / 303 aa
ppa2	59.1% / 303 aa
ppe1	59.9% / 307 aa
ppb1	37.0% / 292 aa

他の生物のPPase

SIT4	59.7% / 305 aa	S.cerevisiae
PPH3	61.0% / 308 aa	S.cerevisiae
PPX	71.6% / 303 aa	rabbit
PPV	56.7% / 307 aa	Drosophila

```
dis2 101:DRGKQSLEVICLLLAYKIKYPENFFILRGNHECASINRIYGFYDECKRRYNI-KLWKTFTDCFNCLPIAAIIDEKIFTMHGGLSPDLNSMDQIQIRMRPT
sds21 101:DRGKQSLEVICLLFAYKIKYPENFFLLRGNHEFASINRIYGFYDECKRRYSI-KLWKTFTDCFCNPVAAVIDEKIFCMHGGLSPDLNSLDQIQIRIRPT
ppa1 101:DRGYHSVETVSLLIAFKIRYPQRITILRGNHESRQITQVYGFYDECLRKYGANVANWQYFTDLFDYLPLTALIEDRIFCLHGGLSPSIDTLDHVRILDRVQ
ppa2 101:DRGYHSVETVSLLVMAMLRYPNRITILRGNHESRQITQVYGFYDECLRKYGANSANWKHFNTLFDYFPLTALIEDRIFCLHGGLSPSIDSLDHSVRLDRVQ
ppe1 101:DRGYFSLETFTFLFMLLKARYPDKITLLRGNHESRQITQVYGFYDECQTKYGANVANWKYCQVFDFLTAAVIDNKILCVHGGLSPEVRTLDQIRILARAQ
ppe2 101:DRGFYSVETFLLLLTLCKYPKEMTLIRGNHESRQITQVYGFYDECVRKYGSANVWRYYCEIFDYLSLGALVDGKVFCVHGGLSPSISIIDQIRLLDRKQ
```

```

dis2 201:DVPDTGLLCDLLWSDPDKDLTGWGDNDRGVSFTFGPDVVSRLFKHMDLVCAHQVVEDGYEF-FSKRQ--LVTLFSAPNYCGEFDNAGAMMSVDESLLCS
sds21 201:DIPDTGLLCDLVWSDPEKDLTGWGENDRGVSYTFGADVVSRLFKHDLICRAHQVVEDGYEF-FGKRQ--LVTLFSAPNYCGEFDNVGAMMSVNEDLLCS
ppa1 201:EVPHEGPICDLLWSDP-DDRPGWGISPRGAGYTFGPDIAEAFNHNHGLDLIARAHQLVMEGYNW-TTNN--VVTIFSAPNYCYRCGNQAAIMGIDDHINYA
ppa2 201:EVPHEGPMCDLLWSDP-DDRCGWGISPRGAGYTFGQDISEFNHANGSLTARAHQLVMEGFNW-AHDGD--VVTIFSAPNYCYRCGNQAAILEVDDTMNQV
ppe1 201:EIPHEGSFCDLMWSDP-EDIESWTVSPRGAGWLFGSKVTTEFSQINDLTLIARAHQLVQEGYKYHFADKN--LVTVWSAPNYCYRCGNVASVMKVDESLEPE
ppe2 201:EVPHEGAMCDLLWSDP-EDISGWGLSPRGAGFLFGADVSEFNRLDLSFIARAHQLVMEGYKIHFSDDK VVTWSAPNYCYRCGNVASILQLDENQTS
      * * * * *

```

-KQYPKFTNEEDSELDSDSASPVDSPAPGDIITIPEKDKGS-

```
dis2 301:FQILKPAEKKQRYGYQSSQNWHMTPPRKNKTGNSK
sds21 301:FQILKPAEKKRQVSQSSIKESK SATNSLKSKSNN
ppa1 301:FIQYDTAPR-KEELHVTTRTPDYFL
ppa2 301:FLQFDAPR-EGEPIAARTPDYFL
ppe1 301:FRISAVADEDRTPVPSRKRSYFI
ppe2 301:FKIFGTASQERSGIPTKRPIADYFL
```

図17. ppe2と他のフォスファターゼのアミノ酸配列の比較

(a) 分裂酵母dis2、sds21、ppa1、ppa2、ppe1、ppe2の比較を示した。すべてで一致する残基に\*印をつけた。ppe2にのみ、他にはない41残基の挿入配列が存在する。





ブクローニングを行った。

2.2kbのHindIII断片がppe1のプロープにハイブリダイズしたので、これをサブクローニングして、塩基配列決定を行った(図15)。その結果、新しいフォスファターゼ遺伝子を見だし、ppe2+と名付けた(図16)。イントロンと思われる配列を二つ含んでいた。予想される遺伝子産物のアミノ酸配列は348残基、予想分子量は39.2kdであった。予想アミノ酸配列には、C末端から55残基の位置に、他のPPaseには見られない41残基の配列が挿入されていた。この部分の塩基配列にはイントロンのコンセンサス配列は見つからず、またこの配列を挟むようなプライマーを用いて、ゲノムDNAとcDNAをそれぞれ鋳型としてPCRを行ったところ、両者で生成したDNA断片の長さに変化はなかった。

41残基の挿入配列には、4つのグルタミン酸、7つのアスパラギン酸、6つのセリン、2つのスレオニン、5つのプロリン、両端近くに4つのリジンが含まれている。

既知のフォスファターゼとアミノ酸配列を比較すると(表6、図17)、ppe1とppa2の両者に対しての相同性は、それぞれ59%であり、新しいサブファミリーであることが示唆された。他の生物のフォスファターゼでは、ウサギPPX (Brewis et al., 1993)に72%と高い相同性があった。しかし、PPXも挿入配列は持たなかった。

#### ppe2+遺伝子の多コピー導入はppe1+遺伝子破壊株の表現型を抑制する

ppe2+遺伝子を含む多コピープラスミドをppe1+遺伝子破壊株に導入し、低温感受性を抑制するかどうか調べた。ppe2+遺伝子の多コピー導入は20℃での増殖を不完全ながら回復した(図18)。このとき細胞形態も不完全ながら正常に近づいていた。すなわち、ppe2+は、 $\Delta$ ppe1にとって、ppa1+/ppa2+、dis3+、pck1+と並ぶ、第4の多コピーサプレッサーであった。

#### ppe2+遺伝子は増殖に必須でない。

N末端から53残基にあたる部分のEcoRV部位にura4+遺伝子を挿入してppe2+遺伝子を破壊した(図19)。四分子解析の結果、ppe2+遺伝子破壊株は増殖可能であった。Southern解析により、ゲノム上のppe2+遺伝子が確かに破壊されていることを確認した。ppe2+遺伝子破壊株では、特に異常がみられなかった。

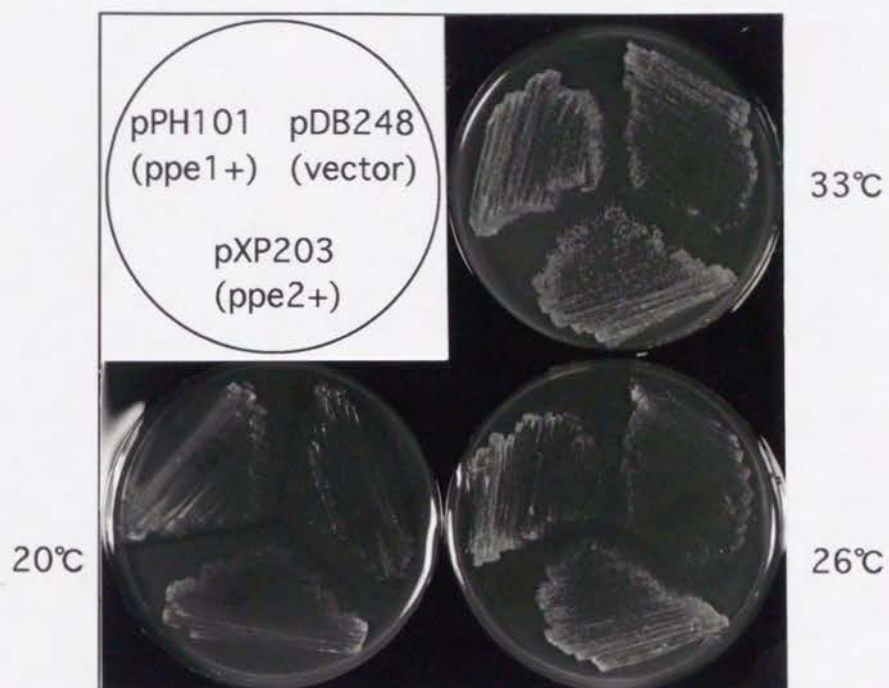
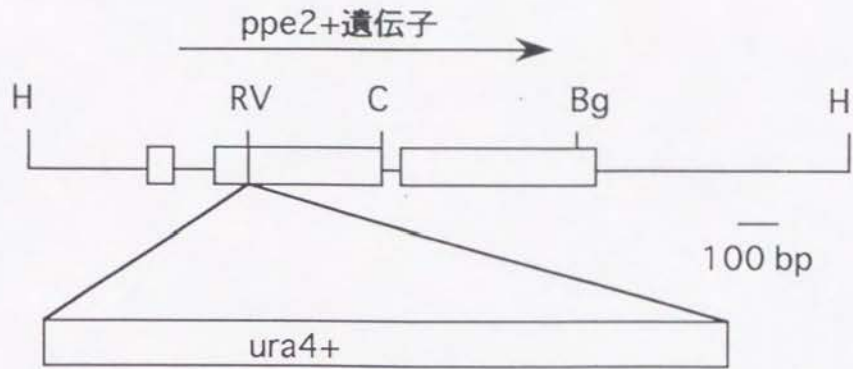


図18. ppe2+遺伝子の多コピー導入によるppe1+遺伝子破壊株の低温感受性の抑制

ppe1+遺伝子破壊株にpDB248、pPH101、pXP203をそれぞれ導入し、EMM2寒天培地にストリークし、33℃、26℃、20℃でそれぞれ4日間培養した。



a



b

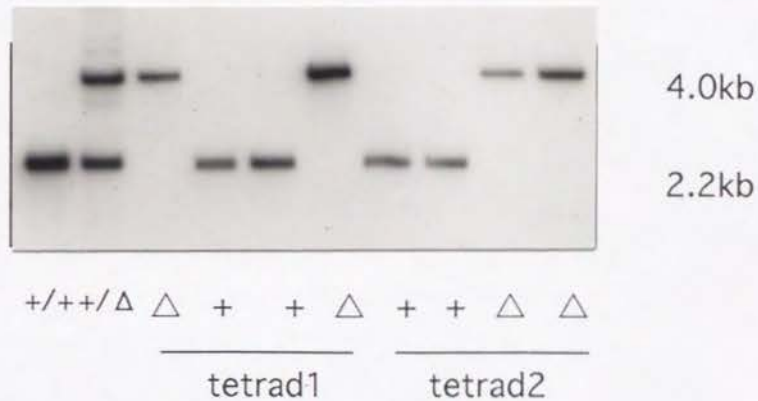


図19. ppe2+遺伝子破壊

(a)ppe2+遺伝子破壊の構成

ppe2+遺伝子中のEcoRV部位にura4+遺伝子のHindIII断片を平滑末端化して挿入した。ここから、4.0kbのHindIII断片を切り出し、*S. pombe*二倍体株に導入した。H: HindIII, RV: EcoRV, C: ClaI, Bg: BglIII

(b)ppe2+遺伝子破壊の確認

ゲノムDNAをHindIIIにより消化し、サザン法を行った。ppe2+遺伝子を含む2.2kbのHindIII断片を<sup>32</sup>P標識し、プローブとして用いた。

+/+: 野生型二倍体,

+/Δ: ゲノムの片方にのみ破壊されたppe2遺伝子を持つヘテロ二倍体,

+およびΔ: ヘテロ二倍体からの一倍体segregantsの一組,

+は野生型ppe1+遺伝子、Δは破壊されたppe2遺伝子を持つことを表す。

## ppe2<sup>+</sup>遺伝子の過剰発現の効果

nmt promoterを持つプラスミドベクターpREP1にppe2<sup>+</sup>遺伝子を挿入し、野生型細胞に形質転換導入した。チアミンを含まないEMM2プレート上では、チアミンを含んだ培地上に比べて、コロニーの大きさが小さかった（図20a）。チアミンを含まないEMM2液体培地にシフトしてから14時間以降は、ほとんど増殖が停止した（図20b）。18時間後では、細胞が長くなっており、（平均長で、+チアミン11.8  $\mu$ m, -チアミン18時間後15.2  $\mu$ m）、隔壁を持たない2核の細胞が、全体の8%程度見られた（図20c）。TAT1 (Woods et al., 1989)による染色では、これらの細胞では、間期の野生型細胞で観察されるような細胞質微小管が観察された。

## ppe2<sup>+</sup>遺伝子産物の同定

イントロンを除いたppe2<sup>+</sup>コード領域の全長（cDNAを鋳型としたPCR断片）をT7 promoterにつないだ融合遺伝子を作成した。大腸菌で発現させたところ44kdの蛋白質を産生したので、これを粗精製して、ウサギに免疫し、抗血清を得た。アフィニティー精製した抗体を用いたイムノブロット法により、44kdのバンドが検出された（図21）。

## ppe2<sup>+</sup>遺伝子産物の細胞内局在

抗ppe2抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。野生株では、細胞質が弱く、核が強く染色された（図22）。DAPIによるDNAの染色像と比較すると、染色体領域と重なる領域が特によく染まっていた。有糸分裂途中の核を持った細胞でも、DAPI染色と重なる領域が強く染色された。ppe2<sup>+</sup>遺伝子破壊株では、細胞の全体がほとんど染色されなかった。ppe2<sup>+</sup>遺伝子を含む多コピープラスミド導入株では、細胞質が強く染色され、核が薄く抜けて見える細胞が多く観察された。イムノブロット法によると、この株では、野生株の数倍のppe2蛋白質が発現していた。過剰発現されたppe2蛋白質は、細胞質に蓄積するのかもしれない。nmtプロモーターにつないだppe2<sup>+</sup>遺伝子を持つプラスミドの導入

a

+チアミン

-チアミン



pXP205 pREP1  
(nmt-ppe2) (vector)

図20. ppe2+遺伝子過剰発現の効果

(a)コロニー形成

pXP205を導入した野生株とベクターpREP1を導入した株のそれぞれを、チアミンを含むEMM2寒天培地とチアミンを含まないEMM2寒天培地にストリークし、33℃、3日間、培養した。pXP205導入株では、チアミンを含まない培地ではほとんどコロニーを形成できなかった。

(b)液体培地での増殖阻害

pXP205を導入した野生株とベクターpREP1を導入した株のそれぞれを、チアミンを含むEMM2液体培地とチアミンを含まないEMM2液体培地中で、細胞数 $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整して33℃で培養を開始し、10時間後から2時間おきに細胞数を測定した。

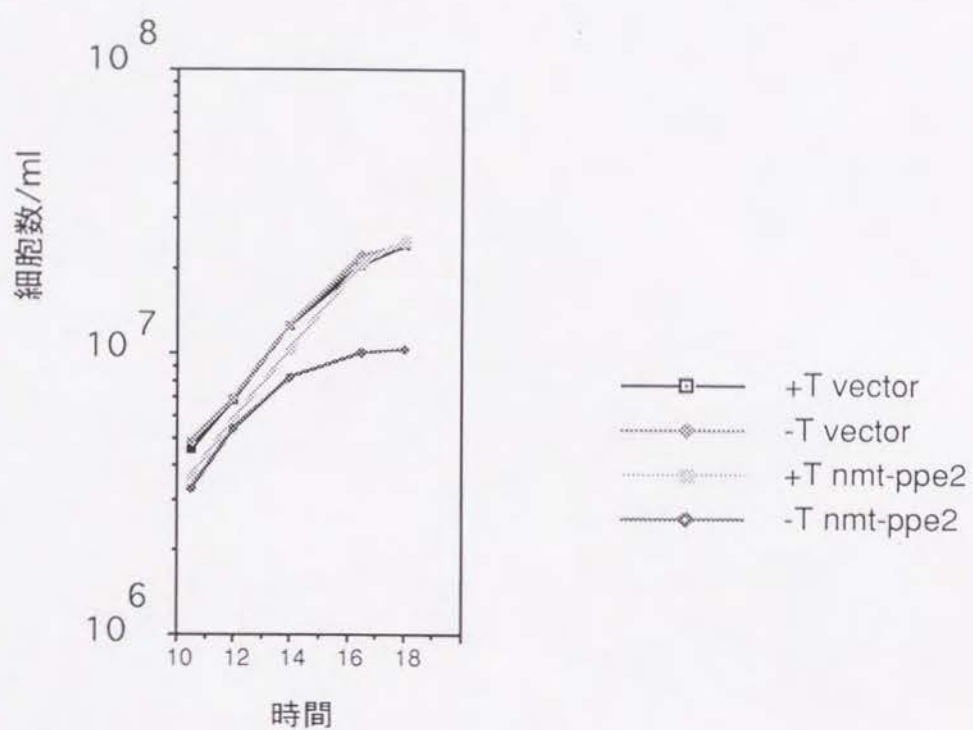
(c)細胞のDAPI染色

pXP205導入株をチアミンを含まないEMM2液体培地中で33℃、18時間培養し、DAPI染色して蛍光顕微鏡で観察した。細胞長が全体に野生型細胞よりも長く、間期の核を2つ持ち、隔壁を持たない異常な細胞が約8%の頻度で観察された (-チアミン)。有糸分裂中の細胞を白矢印で示した (+チアミン)。

次頁に続く



b



c

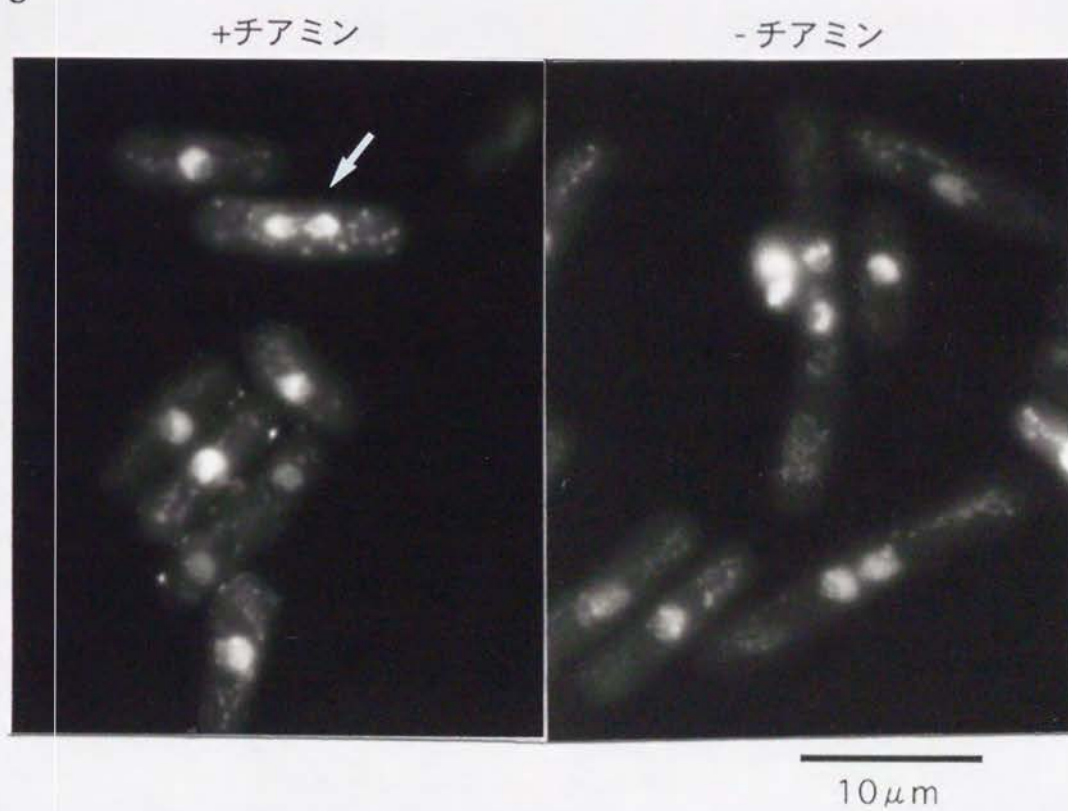


図 20. の続き

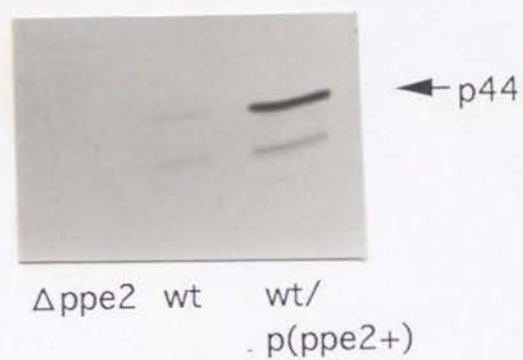


図21. ppe2+遺伝子産物の同定

野生株、ppe2+遺伝子破壊株、ppe2+遺伝子多コピー導入株、それぞれの細胞抽出液を15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、抗ppe2抗体でイムノプロットした。約44kdのppe2+遺伝子産物が検出された。

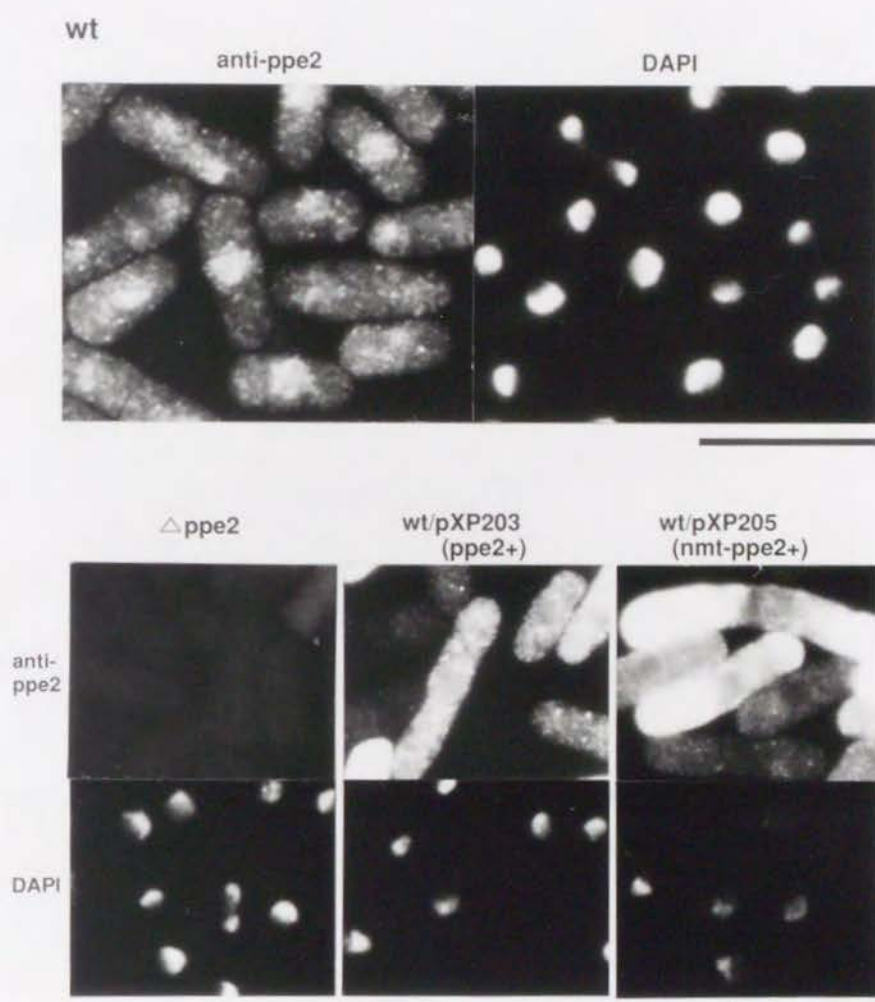


図22. ppe2+遺伝子産物の細胞内局在

野生株、ppe2+遺伝子破壊株、pXP203導入株、pXP205導入株を、グルタルアルデヒド・ホルムアルデヒド固定し、抗ppe2抗体およびDAPIで染色した。図右下のバーはそれぞれ10 $\mu$ m。野生株では、核が特に強く染色された。中でも、DAPIによる染色と一致する部分が特によく染まっていた。ppe2+遺伝子破壊株では、細胞全体にわたって全く染まらなかった。pXP203導入株、pXP205導入株では、細胞質の染色が濃くなっていた。



株でも、培地中からチアミンを除いて16時間後には、ほとんどの細胞で細胞質領域が濃く染色され、核が薄く抜けて見えた。

## 考察

### ppe1<sup>+</sup>遺伝子の必須機能

ppe1<sup>+</sup>遺伝子は生育に完全に必須ではないが、遺伝子破壊株は生存率が低下し、低温感受性致死となる。許容温度であっても、世代時間は野生株よりもかなり遅い。ppe1は、これまでに同定された分裂酵母のセリン／スレオニンフォスファターゼのなかで、特徴的な細胞機能を有していると考えられる。ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株の細胞が異常な形態となることは、分裂酵母の他のフォスファターゼの変異株では見られない表現型である (Ohkura et al., 1989; Booher and Beach, 1989; Kinoshita et al., 1990; Kinoshita et al., 1991a; Yanagida et al., 1992; Yoshida et al., unpublished)。ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株では、許容温度下で増殖する細胞でもこの表現型が観察され、ppe1<sup>+</sup>遺伝子は細胞の形態を制御しているように見える。しかし、ppe1フォスファターゼが実際にどのように桿型の細胞形態の形成に関与しているのかは不明である。ppe1<sup>+</sup>遺伝子を含むプラスミドが、細胞形態の表現型を完全に相補するので、ppe1<sup>+</sup>遺伝子の欠損が単独でこの表現型に関与している。PKC関連遺伝子pck1<sup>+</sup>は、細胞形態制御に関する機能をppe1<sup>+</sup>遺伝子と共有しているかもしれない。

### 細胞長の変化について

ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株の細胞長は野生株に比較してかなり短くなっている。制限温度下での細胞の平均長はwee1-50変異株(Fantes 1981; Russell and Nurse 1986, 1987)と同程度である。しかし、ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株は、細胞の幅（または、太さ）が野生株よりも太いという点においてwee1-50変異株と異なっている。したがって、細胞の体積は、野生株とそれほど変わらないのかもしれない。wee1-50変異株では細胞の体積は野生株のおよそ半分である。この違いから、ppe1<sup>+</sup>遺伝子破壊株の細胞長が短くなる表現型は、wee表現型とは異なる現象であると考えられる。wee1-50  $\Delta$ ppe1二重変異株は生育可能であるので、これらは必須機能を共有しない。 $\Delta$ ppe1の細胞長は26℃では33℃よりも短い。低温感受性と細胞長の間に因果関係があるのかもしれない。

## 細胞形態の変化について

アミノ酸配列と変異株の表現型の相補から、出芽酵母SIT4遺伝子はppe1+遺伝子の機能的ホモログとみなすことができるが、SIT4遺伝子の変異株には、異常な細胞形態は見られない(Arndt et al., 1989; Sutton et al., 1991)。SIT4とppe1のアミノ酸配列の相同性は72%と高く、また、 $\Delta$ ppe1の表現型がSIT4遺伝子の多コピー導入によって相補される。しかし、出芽酵母の野生株ではもともと細胞の形は丸いので、棹型の細胞形態を作り出す機構は、分裂酵母に特異的であって出芽酵母にはないものなのかもしれない。あるいは、ppe1/SIT4フォスファターゼの欠損が細胞骨格の変化を引き起こし、分裂酵母の細胞形態を著しく変化させるのかもしれない。しかし、ppe1+遺伝子破壊株で抗チューブリン抗体染色を行うと、丸い細胞で、スピンドルを持つものも、細胞質微小管を持つものも観察され、微小管系に重大な異常が生じているとは考えにくい。アクチン系に何らかの異常があるかどうか興味深い。ppe1変異株とsit4変異株のもう一つの大きな差異は、制限的条件下でのDNA含量の測定で見いだされた。ppe1+遺伝子破壊株ではほとんどの細胞がG2期のDNA含量を持っているのに対し、sit4変異株ではG1期のDNA含量を持つ細胞の蓄積が報告されている。この差異の生じる根拠は、理解されていない。出芽酵母において、2A型フォスファターゼの触媒サブユニット(Ronne et al., 1991)と制御サブユニット(Heary et al. 1991)のそれぞれの変異による細胞形態の異常が報告されているが、これもppe1+遺伝子破壊株の表現型と直接比較できない。

## 接合能の欠損について

接合時には、1) 細胞がG1期停止する。2) 接合に必須な遺伝子が発現誘導される。3) 細胞が相手の細胞と融合するために変形する。という3つの現象が起きるが、ppe1+遺伝子破壊株の接合不能がこれらのどれの異常によるのか、興味深い今後の課題である。

## 関連因子について

$\Delta$ ppe1の多面的な表現型は多コピーサプレッサーの機能と整合性がある。 $\Delta$ ppe1の多



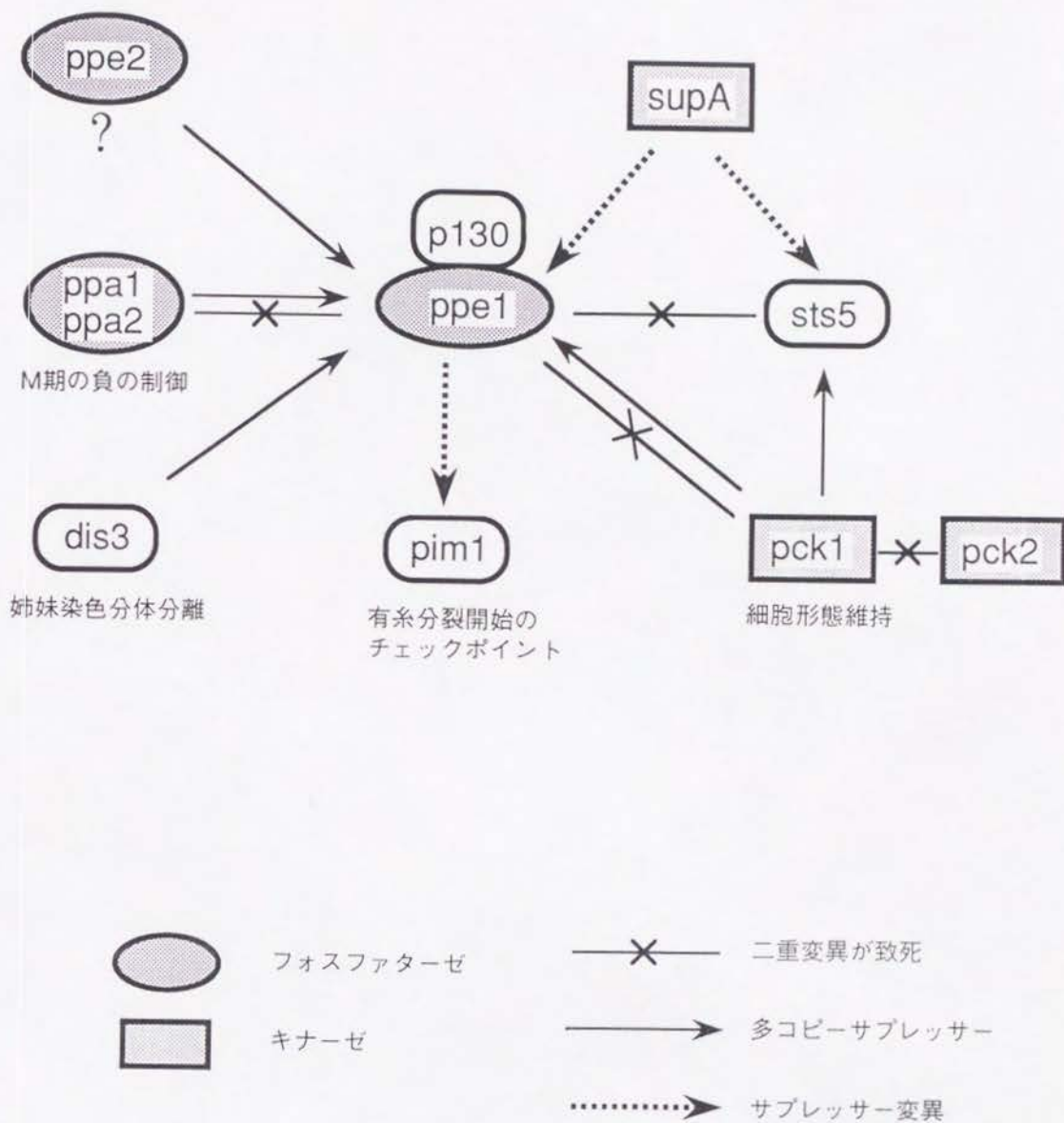


図23. ppe1と機能連関する因子のまとめ

遺伝的な相関関係を示した。実線に矢印は、対象の遺伝子の変異に対して多コピーサプレッサーであることを、点線に矢印は、対象の遺伝子の変異に対して、サプレッサー変異があることを示す。

コピーサプレッサーは4種類のグループに分類される。すなわち、2A型フォスファターゼ関連のppa1およびppa2フォスファターゼ(Kinoshita et al., 1990)、本研究により発見された新しいフォスファターゼppe2、有糸分裂に必要な蛋白質dis3 (Kinoshita et al., 1991b)、PKC関連キナーゼpck1 (Toda et al., 1993)である。

## 2A型フォスファターゼ関連、ppa1+遺伝子、ppa2+遺伝子

ppe1-ppa2が致死であるので、これらの異なるフォスファターゼは、生育に必須な基質を共有しているのかもしれない。ppe1、ppa2間のアミノ酸配列の相同性は約50%であり、ppe1、dis2間のものより有為に高い。ppa2+遺伝子の欠損はsemi-wee表現型を示す。細胞長の制御に関わる基質蛋白質が、ppe1とppa2の両者によって制御されているのかもしれない。ppe1とppa2の両者またはいずれか一方の機能の欠損によって、そのような基質蛋白質の活性が低下または上昇して、正常な細胞長に達することができなくなるのかもしれない。

## ppe2+遺伝子

ppe2+遺伝子はppe1+遺伝子をプローブとするハイブリダイゼーションによって単離されたが、一次構造の相同性から考えると、ppe2とppe1、ppe2とppa2、それぞれ60%程度であり、これらといわゆるホモログである可能性は低いと思われる。遺伝子の過剰発現の効果も、細胞内局在も、ppa2、ppe1のいずれとも異なっており、これらのそれぞれ主とする機能が異なったものであることを示唆する。ppe2+遺伝子の多コピー導入によるppe1+遺伝子破壊株の表現型抑制は、ppa2+遺伝子によるものと同様で、完全ではない。一部の基質を共有するのかもしれない。ppe2+遺伝子破壊株には、特に異常が見られないが、他のフォスファターゼ遺伝子との二重変異の解析は、重要な今後の課題である。ppe2に特徴的な挿入配列は、コンセンサス配列を持つセリン・スレオニンフォスファターゼでは、他に例をみない。この配列の役割についても興味深い。また、染色体領域と細胞内局在を共にするようにみえることから、クロマチン蛋白質を基質とする可能性も考えられ、興味深い。ppe2遺伝子の過剰発現は、細胞の生育を停止させる。このとき、細胞の平均長は30%程度伸びており、中には、間期の核を二つ持ち、隔壁を持たない細



胞が8%程度観察された。ppe2は隔壁形成かG2期調節の機能を持つのかかもしれない。あるいは、過剰産生されたppe2蛋白質は細胞質に大量に存在するようになるので、この異常は、ppe2が本来とは異なる基質に作用した結果である可能性もある。

### dis3+遺伝子

dis3+遺伝子の多コピー導入はppe1+遺伝子破壊の表現型を抑制する。dis3変異は、有糸分裂期に染色体の不分離を引き起こす。これはdis1変異およびdis2変異にも共通に見られる表現型であり、有糸分裂期を完了することができないことを示している。dis3+遺伝子は110kdの必須な蛋白質をコードしているが、dis2-dis3二重変異株が致死であることより、dis2+遺伝子との機能連関が示唆される。dis2+遺伝子は1型フォスファターゼの触媒サブユニットをコードする。出芽酵母で、dis3+と有為な相同性を持つSSD1/SRK1遺伝子がsit4変異を抑制するので、dis3+遺伝子とppe1+遺伝子の関係は出芽酵母におけるSIT4とSSD1/SRK1の関係とよく似ている(Sutton et al., 1991)。このようにdis3はppe1と関連しているが、両者の具体的な関係は明らかではない。ppe1-dis3二重変異株は両者の掛け合わせが困難であるので、得られていない。dis変異株において姉妹染色分体の不分離を引き起こすような異常な有糸分裂は、 $\Delta$ ppe1においては20°Cでも観察されなかった。したがって、dis3+遺伝子を含む多コピープラスミドによって $\Delta$ ppe1が抑制される理由は明らかでない。dis3蛋白質の分子的な機能はほとんどわかっていない。dis3蛋白質は核に多く存在し、生育に必須であるが、dis3+遺伝子破壊により致死となった細胞の終末表現型は細胞周期特異的なものではない。dis3とppe1が直接相互作用するかどうかは、今後明らかにすべき課題であるが、免疫沈降実験では抗dis3抗体でも抗ppe1抗体でも共沈はしなかった。あるいは、dis3は、後述するM期の制御因子pim1や、その関連蛋白質spi1などと相互作用しているのかかもしれない。ppe1フォスファターゼの有糸分裂における機能は今後の課題である。

### PKC関連、pck1+遺伝子

PKC関連遺伝子pck1+の多コピー導入もppe1+遺伝子破壊の表現型を抑制する。pck1+遺伝子と高い相同性を持ち必須機能を共有するpck2+遺伝子の欠損表現型が、細胞が変



形して洋なし型となる、*ppe1*+遺伝子破壊株の表現型に似たものである(Toda et al., 1993)ことから、*ppe1*フォスファターゼと\Delta ppe1\Delta pck1二重変異株が致死であることは、これらが必須機能を共有していることを示している。*ppe1*フォスファターゼは、直接または間接に、*pck1/pck2*キナーゼの活性を正に制御しているのかもしれない。この仮説は、*ppe1*+遺伝子破壊株がスタウロスポリンに対して超感受性を示すことと整合性がある。これら二つの遺伝子は、細胞形態形成に関与するようである。

### *pim1*+遺伝子

米国Cold Spring Harbor研究所の松本らにより、*ppe1*+遺伝子の変異(*esp1*)が、有糸分裂のタイミングを調節する因子esp1変異株の表現型は、*ppe1*遺伝子破壊株の表現型と類似していた。*pim1*変異株は、制限温度下でG1/S期停止した細胞が有糸分裂に入る、いわゆる”*pim* (premature initiation of mitosis) 表現型”を示す。しかも、*pim1*+遺伝子の機能欠損は、ほ乳類RCC1遺伝子の変異体と同様の、染色体の過剰凝縮を引き起こす。*pim1*蛋白質は、哺乳類RCC1(Ohtsubo et al., 1987)と約30%の相同性を持つ。*pim1*蛋白質の分子機能として、分裂酵母*spi1* GTPaseを不活性型(GDP結合型)から活性型(GTP結合型)に変換する触媒作用が知られている。*pim1*変異は*spi1* GTPaseを多量に発現させると相補される。*spi1* GTPaseは、25kDのRasファミリーの中で新しいサブクラスに分類され、その作用因子はまだわかっていない。*pim1*遺伝子産物は核に存在していることから、DNA複製完了のチェックポイントとして、間期における*cdc2*キナーゼの活性化抑制に重要な役割を持つことが考えられる。*ppe1*の変異がどのような機構で*pim1*変異を抑制するのか、*ppe1*の有糸分裂制御における役割を考えるうえで興味深い問題である。*pim1*または*spi1*は、リン酸化されていて、その脱リン酸化が*ppe1*によって制御されているのかもしれない。あるいは、*spi1* GTPaseのエフェクター経路に*ppe1*があるのかもしれない。

### *sts5*+遺伝子と*supA*遺伝子

登田により、スタウロスポリン超感受性変異として発見されていた*sts5*変異(Toda et

al., 1991)が、*ppe1*+遺伝子破壊との二重変異により致死となることが示された。*sts5*変異は、*ppe1*+遺伝子破壊とよく似た丸い細胞形態を生み出す。このことから、*sts5*+遺伝子産物は、*ppe1*フォスファターゼと非常に密接な関係を持つことが予想されるが、まだ、遺伝子産物は特定されていない。*sts5*変異は生育に影響はなく、低温感受性ではなかった。また、*sts5*変異と*pck1*+遺伝子破壊との二重変異は、致命的ではなかった。また、登田により、*ppe1*+遺伝子破壊のサプレッサー変異が単離されたが、そのひとつ、*supA*変異は、*sts5*変異のサプレッサー変異でもあった。このことも、*sts5*+遺伝子産物と*ppe1*フォスファターゼとの関係が密接なものであることを強く支持する。また、*supA*+遺伝子産物がプロテインキナーゼであることが明らかになり、*supA*と*ppe1*が拮抗的に働いていることが示唆された(Toda et al., unpublished)。

## p130

*ppe1*を特異的に認識する抗体によって*ppe1*と共沈する蛋白質p130は、*ppe1*フォスファターゼの調節サブユニットである可能性が高いと考えられる。出芽酵母SIT4にも、特異的抗体によって共沈する蛋白質、p190とp155が存在する。これらのSIT4への結合はG1/S期に変動することが報告されている(Sutton et al., 1991)。p130の実体は何であるかとともにその細胞周期における挙動も非常に興味深い問題である。

## おわりに

本研究によって明らかになった様々な関連因子が、具体的にどのような分子機能を持って相互作用するのか、将来の課題であるが、その機能の分子レベルでの理解には生化学的な裏付けが必要である。しかし、フォスファターゼの基質は、特異的なキナーゼによって特異的な部位がリン酸化された蛋白質でなければならぬため、フォスファターゼの生化学的研究には困難が付きまとう。フォスファターゼの基質を発見することも重要なステップであり、そのためにも、酵母のような系で遺伝学的解析を行うことはまた重要である。



## 材料と方法

### 酵母菌株、大腸菌株および培地

本研究に用いた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、すべて972h<sup>+</sup>及び975h<sup>-</sup>に由来する。目的に応じて以下の大腸菌株を使用した。プラスミドの調整にはMM294、T7プロモーターによる融合タンパク質の発現にはBL21(DE3)を用いた。

大腸菌の培地には、LBおよびLB+ampicilinを用いた。

分裂酵母の培養には、完全培地としてYPD、合成最少培地としてEMM2を用いた。

### 塩基配列決定

stepwise deletion (Henikoff 1984; Yanisch-Perron et al., 1985)により作製した2本鎖プラスミドDNAを鋳型として(Hattori and Sakaki 1986) ジデオキシ法(Sanger et al. 1977)を行い、塩基配列を決定した。Bluescript KS+ (Stratagene)をベクターに用いた。塩基配列決定した領域はそれぞれ結果に示した。

ppe1<sup>+</sup>についてはpPH211とpPH221、ppe2<sup>+</sup>遺伝子についてはpXP201を用いてstepwise deletionを行った。

### 遺伝子破壊

ワンステップ遺伝子置換法(Rothstein 1983; Grimm et al., 1988)によって行った。

ura4<sup>+</sup>遺伝子を含む1.9kbのゲノム断片をppe1<sup>+</sup>遺伝子のKpnI部位に挿入したものを作成し、ここから8.5kbのBglII断片を切り出して分裂酵母二倍体株に形質転換導入した。また、ura4<sup>+</sup>遺伝子を含む1.9kbのゲノム断片をppe2<sup>+</sup>遺伝子のEcoRV部位に挿入したものを作成し、ここから4.1kbのHindIII断片を切り出して分裂酵母二倍体株に形質転換導入した。それぞれ、安定なUra<sup>+</sup>のヘテロ二倍体株をYPD寒天培地上で孢子形成させ、四分子解析を行った。

### FACScan解析

Costello et al. (1986)に従い、FACScan (Beckton Dickinson)を用いて測定した。

### 遺伝子過剰発現

*S. pombe*のnmt1プロモーター(Maundrell, 1990)を持つプラスミドベクターpREP1を用い



た。培地中にチアミン ( $2\mu\text{M}$ ) が存在する場合は、*nmt1* プロモーターに続く遺伝子の発現がほとんど抑えられているが、チアミンを含まない培地中では大量に発現する。

*ppe1*+遺伝子の開始コドン直前にNdeI部位を、終止コドン直後にBamHI部位を付加したDNA断片をPCR法で作成し、pREP1に組み込んでpXP101を得た。同様にして、*ppe2*+遺伝子の過剰発現プラスミドpXP201を得た。

pXP101またはpXP201によって形質転換した細胞を、EMM2液体培地+チアミン ( $0.2\mu\text{M}$ ) 中、 $33^{\circ}\text{C}$ で対数増殖的に培養し、EMM2液体培地で二度洗浄した後、 $33^{\circ}\text{C}$ のEMM2液体培地で $1 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度培養を開始した。10時間後から、2時間おきにサンプリングした。

### 抗体作成

Harlow and Lane (1988)に従った。大腸菌での蛋白の産生にT7プロモーターを持つプラスミドベクターpAR3038を用いた(Studier and Moffat 1986)。*ppe1*+遺伝子の開始コドン直前にNdeI部位を、終止コドン直後にBamHI部位を付加したDNA断片をPCR法で作成し、pAR3038に組み込んでpXP101を得た。また、*ppe1*+遺伝子のSspI部位にNdeIリンカーを挿入し、以降、終止コドンまでを含むDNA断片をpAR3040に組み込み、pUM32を得た。これらをそれぞれ大腸菌BL21(DE3)に形質転換導入し、発現させると、pXP102導入株では37kd、pUM32導入株では20kdのポリペプチドを産生した。SDS-PAGEによって、これらを分離、回収してウサギに免疫し、抗血清を得た。(pXP102由来の抗原に対する抗血清(E1-F)よりも、pUM32由来の抗原に対する抗血清(E1-C)のほうが抗原を強く認識した。本論分に掲載したデータはすべて(E1-C)を用いたもの。)

*ppe2*+遺伝子の開始コドン直前にNdeI部位を、終止コドン直後にBamHI部位を付加したDNA断片を、*S. pombe*のcDNAを鋳型としてPCR法で作成し、pAR3038に組み込んでpXP207を得た。大腸菌中で約44kdのポリペプチドを産生した。以下、同様にして抗*ppe2*抗血清を得た。

### 間接蛍光抗体法

基本的にHagan and Hyams (1988)に従った。DNAの染色にDAPI(Toda et al., 1981)、チューブリンの染色にTAT1(Woods et al., 1989)を用いた。

アフニティ精製した抗体を濃縮し、PEMBALバッファーで5倍希釈して一次抗体とした。二次抗体は、FITC標識したヤギ抗ウサギ抗体を200倍希釈して用いた。

### イムノプロット法

Towbin et al. (1979)に従った。適当な培地中で対数増殖期にある分裂酵母細胞を回収し、TEGバッファ(50mM Tris, 1mM EDTA, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mM PMSF)中で、ガラスビーズにより破碎した。14000rpm、10分遠心して上清を回収し、再び遠心を繰り返した。上清を回収し、蛋白量を測定したうえで、SDS-PAGEに用いた。シグナルの検出に、HRP標識した抗ウサギ抗体、および、ECL検出キット(Amersham)を用いた。

### 免疫沈降法

アフィニティー精製した抗ppe1抗体を、プロテインAセファロースビーズ(Pharmacia)と共に3時間、室温で緩やかに振蕩した。TEGバッファ(50mM Tris, 1mM EDTA, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 0.05% NP-40)で3回洗浄した後、イムノプロット法と同様にして調整した分裂酵母細胞抽出液と共に、4℃、4時間緩やかに振蕩した。TEGバッファで3回洗浄した後、SDS-PAGEに用いた。ゲルをクーマシーブルー染色、銀染色して、バンドを検出した。



## 補遺

### pap1<sup>+</sup>依存転写活性を制御する増殖必須遺伝子pad1<sup>+</sup>

#### 序

分裂酵母のPKCとその細胞機能を研究するため、PKCの強力な阻害剤であるスタウロスポリンを用いて、突然変異株と遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、スタウロスポリン超感受性変異を与える11遺伝子座 (sts1-sts11)が発見された(Toda et al., 1991)。また、PCR法によって、PKC様キナーゼをコードする遺伝子、pck1<sup>+</sup>とpck2<sup>+</sup>が単離された(Toda et al., 1993)。sts6とpck2<sup>+</sup>は同一遺伝子座であった。また、sts5は、細胞形態異常表現型の類似性や、二重変異株の致死性などから、pck1<sup>+</sup>、pck2<sup>+</sup>、ppe1<sup>+</sup>などと密接な関係にあることがわかった。

また、sts1変異は、スタウロスポリンのみならず多種の薬剤や金属カチオンなどに超感受性を示し、sts1<sup>+</sup>遺伝子は、鳥類のラミンB受容体と類似性を持つ蛋白質をコードすることがわかった(Shimanuki et al., 1992)。

スタウロスポリン耐性付与を指標として、多コピープラスミドをベクターとする分裂酵母ゲノムライブラリーをスクリーニングし、プラスミドpST1、pST12、pST22、pST23を得た(表A-1)。pST1、pST12、pST22は、互いにオーバーラップしたゲノム断片を含んでおり、これらから、多コピー導入によって薬剤耐性を付与する遺伝子として、AP-1様転写因子をコードする遺伝子pap1<sup>+</sup>が同定された。pST23の多コピー導入による薬剤耐性付与には、pap1<sup>+</sup>遺伝子の存在が必須であった。さらに、pST23を細胞に多コピー導入すると、転写因子pap1に依存した転写活性が増大することを見いだした。pST23上のゲノム断片には少なくとも2つの遺伝子が存在し、pap1依存的な転写促進と薬剤耐性に寄与するのは、MAPキナーゼ関連遺伝子spk1<sup>+</sup>ではなく、その5'上流域に位置する別の遺伝子pad1<sup>+</sup>であることが判明した。遺伝子破壊の結果、pad1<sup>+</sup>は増殖に必須であった。予想されるpad1<sup>+</sup>遺伝子産物は、哺乳類とショウジョウバエのMOV34 (Gridley et al., 1990)に類似性を示した。染色体構造の異常を示す変異crm1は、スタウロスポリン耐性をもたらすことが知られていたが、この耐性付与効果も転写因子pap1に依存していた(Toda et al., 1992)。分子機構は不明であるが、pap1転写因子の活性を、pad1は正に、crm1は負に調節していると考えられる。また、pap1の経路による薬剤耐性はスタウロスポリン特異的なものではないと考えられる。



表A-1 スタウロスポリン耐性を付与するプラスミド

スクリーニング に用いた株	単離された プラスミド	遺伝子	スタウロスポリン耐性 (コロニー形成能)			
			sts1-5	sts2-6	sts3-15	HM123
			0.3	0.3	0.3	0.5 ( $\mu$ g/ml)
sts1-5	pST2	sts1+	+	—	—	—
sts2-6	pST8	sts2+	—	+	—	—
sts2-6	pST1	pap1+	—	+	+	+
sts3-15	pST12	pap1+	—	+	+	+
sts3-15	pST22	pap1+	—	+	+	+
sts3-15	pST23	pad1+	—	+	+	+
	pDB248(vector)		—	—	—	—

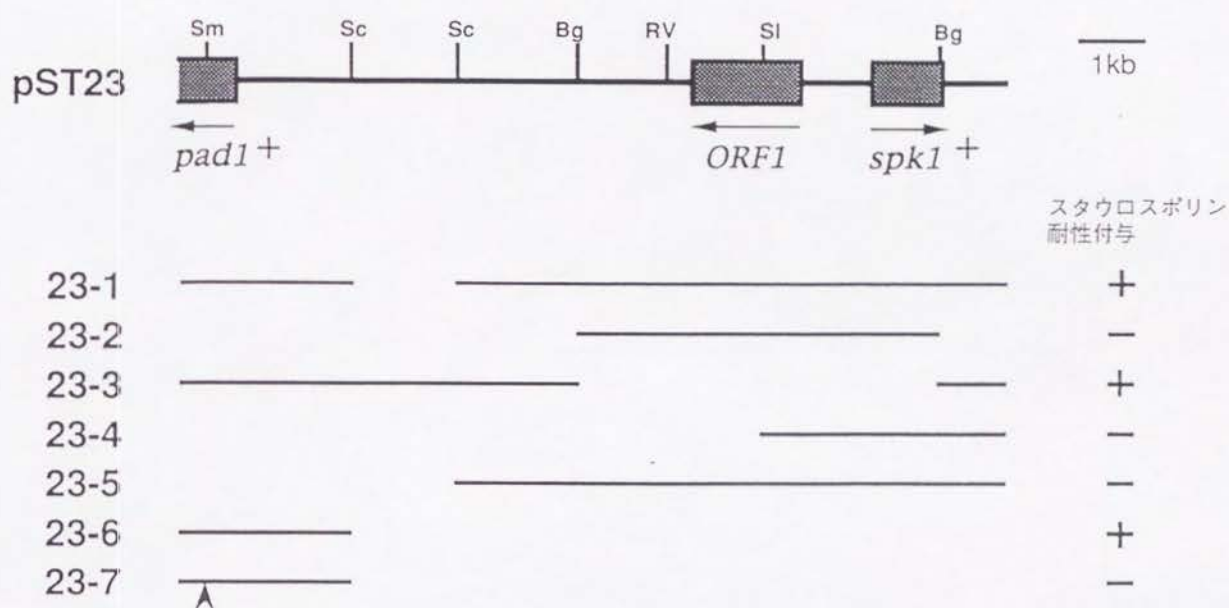
## 結果と考察

### pST23のサブクローニング

スタウロスポリン耐性を付与する多コピープラスミドpST23は、約13kdのゲノム断片を含んでいた。pST23の制限酵素地図を作成し、サブクローニングを行った(図A-1)。pST23は、sts3の多コピーサプレッサーとして単離されたが、野生株に導入しても、そのスタウロスポリン耐性をさらに増大させることがわかった。当初、sts3-15変異株を用いてサブクローニングを行ったところ、pST23-2とpST23-3の両者がsts3-15変異株に耐性付与しない結果となったので、これらの境界のBglII部位付近の塩基配列決定を行い、新しいプロテインキナーゼ遺伝子spk1+を見いだした。予想されるspk1+遺伝子産物はスタウロスポリンがもっとも強く阻害するPKC(プロテインキナーゼC)とは異なり、MAPキナーゼにもっとも高い類似性を持つものであったが、キナーゼ阻害剤耐性にキナーゼ遺伝子が関与することは矛盾のないことと思われた。しかし、spk1+遺伝子を完全に含むサブクローンには耐性付与能がなく、さらにサブクローンを進めると、spk1+とは関係のない領域がスタウロスポリン耐性付与能があることがわかった。そこで、この領域の塩基配列決定を行い、新しい遺伝子pad1+を見いだした。pST23上のゲノム断片では、pad1+遺伝子の3'末端が欠けていた。そこで、pad1+遺伝子の全長を含むコスミドから、約6kbのXbaI断片をサブクローニングして、pad1+遺伝子の全長の塩基配列を決定した。pST23上で欠失している部分は、終止コドンまで100塩基足らずであった。

### pad1+遺伝子産物の他の蛋白質への相同性

pad1+遺伝子は308残基、予想分子量35kdのポリペプチドをコードすることが予想された(図A-2)。データベース検索によると、予想されたpad1+遺伝子産物は、ショウジョウバエとマウスのMOV34に対して類似性を持っていた(図A-3)。また、ヒトの機能不明の遺伝子産物に対しても部分的に有為な類似性を示した。ショウジョウバエMOV34遺伝子は発生途中で致死となる変異を与える遺伝子座として同定されたもので、遺伝子産物の機能は不明である(Gridley et al., 1990)。



図A-1. pST23の制限酵素地図とサブクローニング

各サブクローンのスタウロスポリン耐性付与能の有無を+、-で示した。  
 23-7では、SmaI部位にフレームシフトをおこす変異を導入した。  
 矢印は遺伝子の向きを表す。pad1<sup>+</sup>遺伝子は3' 末端を欠いている。  
 Sm: SmaI, Sc: SacI, Bg: BglII, RV: EcoRV, Sl: Sall



AAGTTCAAGGGCATTCTCCGAGATAAATCACCTTTAGAAGAAAATGGCGTATCTACGTACCAAATNTTCGCTCAAAGGATACAGACTCGGCTATGCCG -701  
 ATTACGGAAGCACAGAAACATTTTGAGTCTGTTGAGGAACAAAGNTTACTTCAGAAAAGCAAAGATGAGCGATTGAAAAACATAAAGACAGNATTGATG -601  
 AGTATAATAGACTACTGGAAAGTCAGTCGGAGCATTGACATGCCTAAAATTTGGACCCGGCTAGTTTTCAAANACGTCCTTTTTCTCTCAATAGCTA -501  
 TACTTAAATAGCAATGGATGCCTCCTCTATTCTGCATAGTTTTCTCCATCCACCTACCATTCTTTATGAAATTACGCACTCTAATGAAATCACTATT -401  
XbaI  
 TTATTTTAAACATACGCATTATACCTCATTATTGTTATAGCTATTCAATTTGCTCTAGAAAAAACCCTGTTTATAGCCAACACCAGTAAACGTATACTA -301  
 GCTGCCTAAGTGAGACCAAGACATAGAATCTTGATATTGTTTTGTATAGTGGTTGAAACATATAGAAAGAACTTCCTTTGAAGAACAAAGCACATTAT -201  
 AGTGACCTTTGATTGTTTTGTCTCTTAAATATCAGTGAACAGCATTAACTGTTTGGTAACCTTATTTAAATACCTTATACTGAGTTTCTCATTTAA -101  
NruI  
 TCTCCAATTACACTTTTATTTGCGGTATTTGAGAGGAACCCCACTGATACTGATAAACTCTCATATTTCAATACATACATACGAGTCATATTTTTCGCG -1  
 ATGGAATCTTTACAAAGATTGTTACAAGTGCCCGCATGGGTACTGGTATGATGGGAGATCAGCCTCTTGTTGATAATCCGAGTGTGTATACATTTCAT +100  
 M E S L Q R L L Q G A R M G T G M M G D Q P L V D N S E C V Y I S S 34  
 CTCTAGCTTTGTTAAAAATGCTTCGTATGGGCGACATGGTACACCAATGGAAGTTATGGGTTTGATGTTAGGAGAATTCGTTGATGACTTTACAGTACG +200  
 L A L L K M L R H G R H G T P M E V M G L M L G E F V D D F T V R 67  
 TGTGTTGATGTTTTGCAATGCCTCAATCTGGTACAGGTGTGAGTGTAGAAGCAGTCGATCCAGTTTTCCAAAAAATATGATGGATATGCTTAAGCAA +300  
 V V D V F A M P Q S G T G V S V E A V D P V F Q K N M M D M L K Q 100  
SmaI  
 ACAGGACGGCCAGAAATGGTTGAGGTTGGTATAATCTCACCCGGTTTTGGTTGTTGGCTTTCTAGTGTGATATCAACACCCAACATCATTTGAGC +400  
 T G R P E M V V G W Y N S H P G F G C W L S S V D I N T Q Q S F E Q 134  
 AATTAACACCAAGAGCGGTGGCAGTTGTTGTCGACCTATTCAATCTGTCAAAGGAAAGGTGGTAATTGACGCTTTTCGATTGATTAATCCGTCTACCT +500  
 L T P R A V A V V V D P I Q S V K G K V V I D A F R L I N P S T L 167  
 AATGATGGGTGAGGAACCCAGACAAACAACTTCCAATTTGGGTACATCAACAAACCTAGCATTCAAGCTTTAATTCACGGTTTAGGAAGACATTACTAC +600  
 M M G Q E P R Q T T S N L G H I N K P S I Q A L I H G L G R H Y Y 200  
 TCCCTTCGATCAATTACAAAAAACTGAGCTTGAAGAGATCATGCTTTTGAATTTACACAAACAGCCTTGGGCACATGGTCTTTTACTTGAAAACTTTA +700  
 S L R I N Y K K T E L E E I M L L N L H K Q P W A H G L L L E N F N 234  
 ATTCGTGTCGGAAAAAATCATGCTTCTATTGATAAGATGAAATCCTTGTGCAAGACGTACACTGAACGTGTTCAAATGAAGTGACTTTAAGTCCGGA +800  
 S A A E K N H A S I D K M K S L S E Q Y T E R V Q N E V T L S P E 267  
 GCAACTTCGATTCAATACGTTGGTAAACAAGATCCCAAGAAGCATCTTGACGCTGAGGTTGAGAAATGTATAGACAACAATATTTCTCCATGTTAGCT +900  
 Q L R I Q Y V G K Q D P K K H L D A E V Q K C I D N N I S S M L A 300  
 TGTATGCTTGATTCCGTTGCCTTCTAGTACATCTATTTTGGTAATACCTCTTTTCCATCATCCGTTTTTATGAGCTACTTTCTTCTTACTCAAAGCA +1000  
 C M L D S V A F \* 308  
 TTTATGAAGTGTGTTGAATAANCTGTTGGTGAATCTGATACTACTTTTTTACGATTTTCAATTCGTGACTAGGAGTACATTTTTTTTAAACCTTTTAC +1100  
 ATGATCGTGGAGTATGATTGATGATATTTTGGTAAGCTCTTGAGATTGCGAGCGTTTGCTTTGATGGATTCTTATATATTTTTTTTATAGATCCTTAAG +1200  
 ATATACCTGCACACCAGTCTTTCAAGCTTCTCCCAATAAGAAAAATTTGTTTCAATTATTGAATTTGTAAACATCTTCTACCAACATGTTAAAAATTTT +1300  
 GTTTCCTTGATTGTTTGAATGTACCTGTAAGGATCGTCGATCAGCGTCAACCATTTGAAGTTGAATACATAAAGGTATAAAGTACTGAGGCTACTTAATTTAT +1400  
 TATATGACATTTTAGCGTGATATGATTTTTGATGTAGCATGATTTGTACTTGTCAAGTATNCTATCTATCTTTCAACCTTTGCCAACCACTAACGTA +1500  
 TGTGGTTTACGGAATCAACAAACAATTGTTTATTAAGAAGTTTAAACAGGTTTCTTTTTATTTTCAACGTTTAAAGACTTGCTCCAATATTTAACTGGT +1600  
 TTTTGAATTCATAATGAATAGATCTGCTGCTTTATCAATCTTAAAGCGCCAAAGTTCTACGGCAGCTTCTTCTTCACTCAAGAGAACTCCTTTATATGA +1700  
 TCTGCATTTAAAGAAGGAGCTACCATAGTCCCTTTGCTGGTTTTTCAATGCCAGTACAGTATAAAGTCAAACCATTAGTGCCAGTCATAAGTGGACAC +1800

図A-2. pad1+遺伝子の塩基配列と予想遺伝子産物のアミノ酸配列

遺伝子破壊に用いたNruI部位、SmaI部位、およびXbaI部位を示した。

```

                                * * * * *
pad1      MESLQRLQGARMCTGMMGDQPLVDNSECVYISSLALLKML-RHGRHGTPMEVMGLML
mMOV34    MP ELAVQKV VVHPLVLLSVVDHFNRIKVGNGKRVVGVLL
C6.1A     MAVQVVQAVQAVHLESDAFLVCLNHALSTEKEEVMGLCIGELNDDTRSDSKFAYTGTEMRTVAEKVD

*      *   * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
pad1      GEFVDDFTVRVVDVFAMP--QSGTGVSVEAVDPVFQKNMMDMLKQTGRPEMVVGWYNHPGFGCWLSSVDINTQQSFEQLTPRAVAVV----VDPIQSVK
mMOV34    GSWQKK-VLDVSNFAVPFDEDDKDDSVWFLDHDYLENMYGMFKKNARERIVGWYHTGP----KLHKNDIAINELMKRYCPNSVLVI----IDVKPKDL
C6.1A     AVRIVHIHSV IILRRSDK--RKDRVEISPEQLSAASTEAEERLAELTGRPMRVVGWYHSHPHITVWP SHVDVRTQAMYQMMDQGFVGLIFSCFIEDKNTKT

* *   * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
pad1      GKVVIDAFRLINPSTLMMGQEPRTTSLN LGHINKPSIQALIHGLGRHYSLRINYKKTELEEIMLLNLHKQPWAHGLLENFN SAAEKNHASIDKMKSL S
mMOV34    GLPTEAYI-----SVEEVHDDGTPTS KTFEHTVTEIGAEEAEVGV EHLRLDI-KDTTVGTL SQRITNQVHGLKGLNSKLLDIRSYLEKVASGKL-PIN
C6.1A     GRVLYTCFQSIQAQKSSEYERIEIPIHIVPHVTIGKVCLES AVELPKILCQEEQDAYRRIHSLTHLDSVTKIHNGSVFTKNLCSQMSAVSGPLLQWLEDR

* *   * *   *   *   *   *   *   *
pad1      -EQYTERVQNEVILSPEQLRIQYVGKQDPKKHLD AEVQKCIDNNISSMLACMLDSVAF
mMOV34    -HQI IYQLQDVFNLLPDASLQEFVKAFY LKTNDQM VVYLASLIRSVVALHNLINNKIANRDAEKKEGQEKEESKKER
C6.1A     LEQNQQHLQELQKEEELMQELSSLE

```

308 aa

321 aa

291 aa

図A-3. pad1と類似性を持つ蛋白質との比較

pad1とショウジョウバエMOV34、ヒトのcDNA6.1A産物との比較。  
三つ以上の配列で同一残基のある部分に\*印をつけて示した。



pad1+遺伝子の多コピー導入によるスタウロスポリン耐性付与は、転写因子pap1に依存する。

pad1+遺伝子とAP-1様転写因子をコードするpap1+遺伝子との間に興味深い関係が見つかった。pad1+遺伝子とpap1+遺伝子はいずれも多コピー導入によって野生株にスタウロスポリン耐性を付与するが、pad1+遺伝子によるスタウロスポリン耐性付与には、pap1+遺伝子の存在が必要であった。pap1+遺伝子は生育に必須ではなく、その遺伝子破壊株は生育可能である。しかし、pap1+遺伝子破壊株にpad1+遺伝子を多コピー導入しても、スタウロスポリン耐性は変化しなかった。

pad1+遺伝子の多コピー導入は、転写因子pap1依存的な転写活性を増大させる。

p25と呼ぶポリペプチドをコードする遺伝子は、その5'上流域にAP-1配列を持ち、pap1+遺伝子産物によって転写制御されている（図A-4）。野生株にpad1+遺伝子の多コピー導入したものでは、p25遺伝子の転写が促進され、p25が過剰産生されていた。しかし、pap1+遺伝子破壊株にpad1+遺伝子を多コピー導入したものでは、p25は全く発現していなかった（図A-5）。すなわち、pad1+遺伝子産物は、転写因子pap1の活性を何らかの形で正に制御していると考えられる。この仮説は、pad1+遺伝子によるスタウロスポリン耐性付与がpap1+遺伝子の存在に依存する事実と整合性がある。p25遺伝子破壊株は生育可能で、これにpap1+遺伝子を多コピー導入してもスタウロスポリン耐性は付与される。したがって、p25は薬剤耐性に直接関与せず、実際に薬剤耐性を担っているのは、転写因子pap1の制御下にある未知の遺伝子産物であると考えられる。

p25の発現誘導はpap1の結合するシス配列に依存する

p25遺伝子は、次の場合に発現誘導が起こることがわかっている。すなわち、pap1+遺伝子の多コピー導入、pad1+遺伝子の多コピー導入、crm1-809変異である。p25遺伝子の5'上流に存在するpap1結合配列に塩基置換を導入し、これがp25遺伝子の発現誘導に与える影響をイムノプロット法で調べた（図A-6）。AP-1部位に変異を持つp25遺伝子は、pad1+遺伝子の多コピー導入では発現誘導されたが、pap1+遺伝子の多コピー導入では、



表A-2. スタウロスポリン耐性

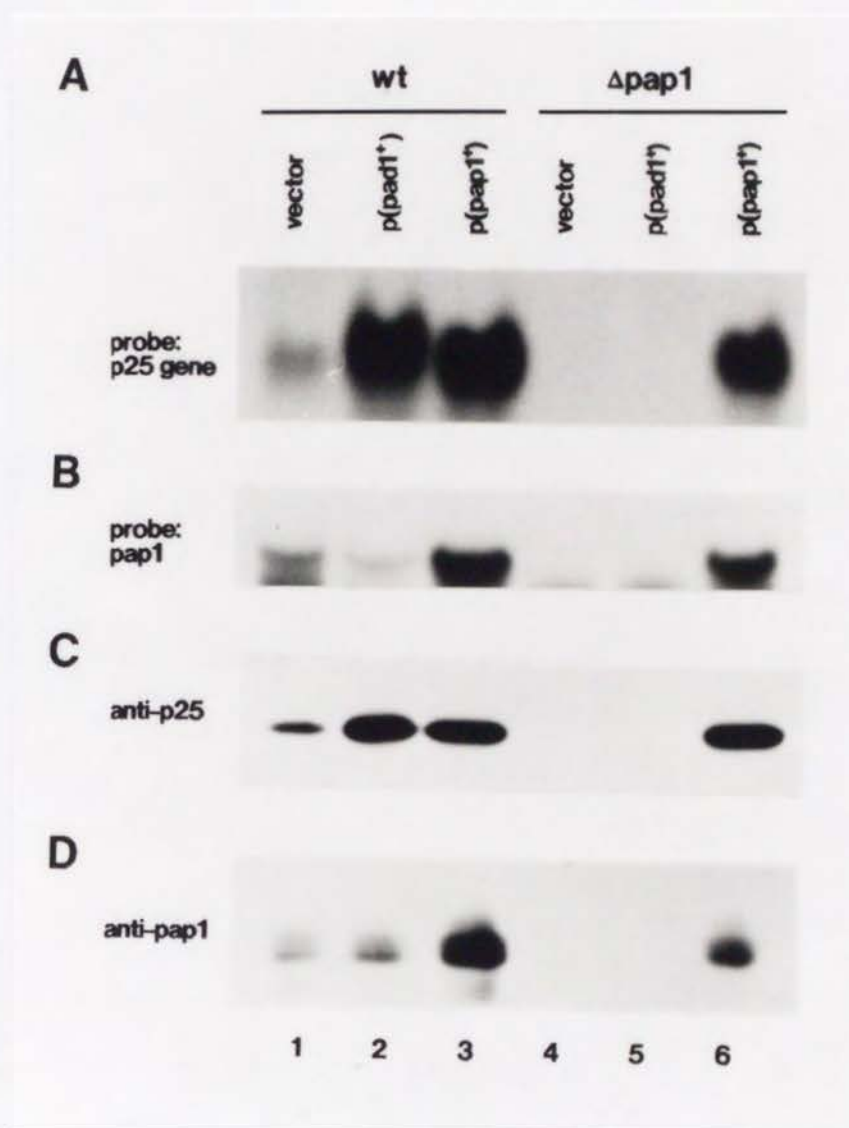
コロニー形成できる最大のスタウロスポリン濃度 ( $\mu$ g/ml) を示した

プラスミド	野生株	pap1+遺伝子破壊株
pDB248	0.3	0.2
vector		
pST1	0.5	0.5
pap1+		
pST23	0.5	0.2
pad1+		

TACAC/AAAACTTTCCAAGGATGATGATGGACTGGCTGACCATCAATGCATTTTGCACCTAAAATAGCGTACGTTTTATCGATTACCGATGTTTTCCAT -601  
TGGGTTGTGTTAAATTAGAGGTGACCGTAACCATGTTATTTTCCCAGTACTAAGTTAGTAGGAAAGCTATAGAGAAACCCAAAGTCCCCCACTTAGGCCA -501  
ACAGTGGCGCAGCTACATCGATAAGCAAAGATGAAAAAGCGATACAAAAGGTCAACACCAAAAACTCATCAAGCGAGCCAAAGTATGTAACCACAGTT -401  
TACAGAAAATGGGACAGGTAATAACAAATGCCAACCTGTGGAATGAAGSTATTTCAAGGCACAAATCGGTTTGTTCATCTAAAGTGAGCATGAATG -301  
AGAGAGAAAGAAATAAATAATAAGAACATCATTGTTTGAATAGGARP-1TTAGTCAGAAATGGTTCAATTTTCACAATCCTAGGATGAACCAAGGAGTTTA -201  
PLD  
CGTAATCTGGTAATCAACCGCTGGTCCCCAAAAAAGGAAATAAAAAAACACATCGGAGGCTTTCAAAAAATCTATATAGGACGTAAAATTCCTA -101  
SnaBI  
TATTTTAAACGTTCCAAAGAAATCAATCACAGCTTCATTCTTCACTGTCGTGCTTCGATTTCGTTATTTTATTACTCCAGCGTTTTATTAAACCCAGT -1  
ATGCTACCGCAACACCGTCGCTATTGTGATTTATCCACTTATGGCCATGTCGTCAAACCTGGCTGAGGCCGAAAAGGCTGGCATTGAGAAAGCTGGTG +100  
M S T A N T V A I V I Y S T Y G H V V K L A E A E K A G I E K A G G 34  
GAAAAGCTGTCATTTATCAGTTCCCCGAGACATTGAGTCTGAAATCTTGGAGAAGATGCATGCTGCACCCAAACCAATTACCTGTGTTACTCTGA +200  
K A V I Y Q F P E T L S P E I L E K M H A A P K P N Y P V V T L D 67  
TGTCTTAACGCAGTATGATGCCTTCCTCTTCGGTTATCCTACACGCTACGGCACTCCTCTGCTCAGTTCCGTACTTTTGGGACTCCACTGGTGGTTTA +300  
V L T Q Y D A F L F G Y P T R Y G T P P A Q F R T F W D S T G G L 100  
TGGGTGCAAGGTGCTTTGCATGGAAGTACTTTGGTCAGTTCTTTTCCACCGGTACCTTGGGCGGTGGTCAAGAAAGCACTGCTCTTACTGCCATGACCA +400  
W V Q G A L H G K Y F G Q F F S T G T L G G G Q E S T A L T A M T S 134  
GCTTTGTTTCATCATGGAATGATTTTGTACCTCTTGGCTATAAGAATACATTTTCACTCATGGCTAACGTTGAGTCCATTTCATGGCGGCTCCAGCTGGG +500  
F V H H G M I F V P L G Y K N T F S L M A N V E S I H G G S S W G 167  
CGCTGGTTCTATGCTGGAGCCGACGGTTCTCGTAATGTATCCGATGATGAAGTAGAAATTGCACGAATTCAAGGTGAGACTTTCTTCAAGACTGTTTTT +600  
A G S Y A G A D G S R N V S D D E L E I A R I Q G E T F F K T V F 200  
CGCAAGTAAGACTTTGCGAATAGTATCTATTGAAACAGTGCAAAATGATTGCACAATTTTGAGTTGAATCACCAACTGGCTTTTTTTGTTTACCGCCCATG +700  
R K \* 202

図A-4. p25遺伝子の塩基配列と予想遺伝子産物のアミノ酸配列

AP-1とパリンドローム (PLD) の二つのpap1結合配列を四角で囲んで示した。予想されるTATA配列を影付けして示した。



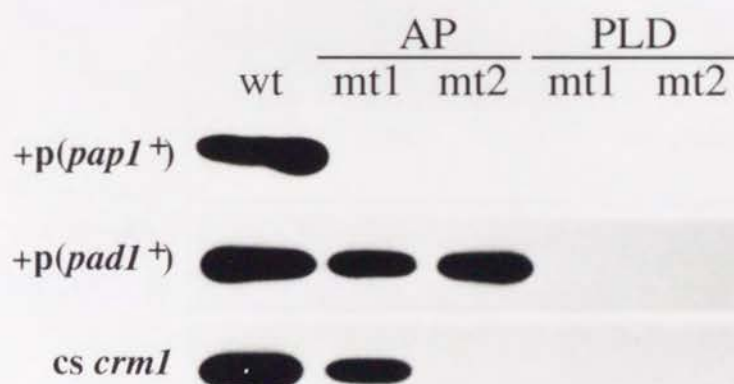
図A-5. *pad1<sup>+</sup>*遺伝子の多コピー導入による*pap1<sup>+</sup>*依存的転写の誘導

1レーンあたり10 $\mu$ gの全RNAを泳動し、ノーザン法を行った。(A)ではp25遺伝子断片を、(B)では*pap1<sup>+</sup>*遺伝子断片を<sup>32</sup>P 標識し、プローブとした。野生株に*pad1<sup>+</sup>*遺伝子を多コピー導入したものでは、p25のmRNAが大量に検出されるが、このとき*pap1<sup>+</sup>*のmRNA量は増えていない。また、*pap1<sup>+</sup>*遺伝子破壊株に*pad1<sup>+</sup>*遺伝子を多コピー導入したものでは、p25のmRNAは全く検出されない。

また、それぞれの細胞抽出液を調整し、イムノブロット法を行った。(C)は、抗p25抗体、(D)抗*pap1*抗体によって検出した。それぞれについて、A、Bのノーザン法において検出されたmRNA量に対応した量の遺伝子産物が検出された。



	AP-1	Palindrome
wt	TTAGTCA	AGTTTACGTAATCT
AP-mt1	A-TC—	—
AP-mt2	-CC—	—
PLD-mt1	—	—A-T—
PLD-mt2	—	—GG—C



図A-6. p25遺伝子のpap1結合部位への変異導入

pap1結合配列に変異導入したp25遺伝子を持つプラスミドをp25遺伝子破壊株に形質転換導入した株を用いて、抗p25抗体によるイムノブロット法により、以下の3つの条件下でのp25の産生を調べた。1) pap1+遺伝子の多コピー導入、2) pad1+遺伝子の多コピー導入、3) crm1-809変異の導入。

1)、2) は変異p25遺伝子のプラスミドとpap1+遺伝子またはpad1遺伝子のプラスミドをp25遺伝子破壊株に同時に形質転換導入した株を用い、3) は、 $\Delta$ p25 crm1-809二重変異株に、変異p25遺伝子のプラスミドを導入した株を用いた。

全く誘導されなかった。crm1-809変異では、AP-mt1変異は発現誘導されたがAP-mt2変異は発現誘導されなかった。パリンドローム部位に変異を持つp25遺伝子は、いずれの場合にも全く誘導されなかった。pap1はp25の発現には必須である。パリンドローム配列は、発現誘導に必須である。pap1以外にもp25の発現に関与する転写因子が存在する可能性が示唆される。

### pad1+遺伝子産物の同定

T7プロモーターの下流にpad1+遺伝子のORF中にあるNruI部位以降をつなぎ、大腸菌で発現させて分子量約40kdの融合蛋白質を得た。これをSDS-PAGEで粗精製して回収し、ウサギに免疫して抗pad1抗体を得た。

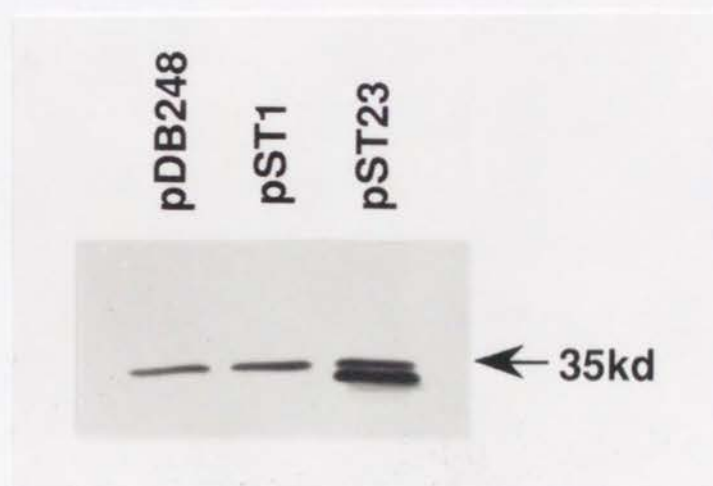
イムノブロット法により、分子量約35kdのpad1+遺伝子産物が同定された。3'末端を欠失したpad1+遺伝子を持つプラスミドpST23を導入した株では、35kdに加えて、33kdのポリペプチドが検出された（図A-7）。

pad1+遺伝子産物の細胞内局在を調べるため、3種類の固定法（メタノール固定、フォルムアルデヒド固定、フォルムアルデヒド・グルタルアルデヒド固定）で、間接蛍光抗体法を行ったが、有為な染色像は得られなかった。

### pad1+遺伝子は生育に必須である。

pad1+遺伝子の開始コドンごく近傍のNruIからORF中ほどのSmaI部位までをura4+遺伝子で置換し、分裂酵母二倍体細胞に導入して、四分子解析を行った（図A-8）。胞子は、2:2の生存パターンを示し、生育可能であったコロニーはすべてウラシル要求性であった。したがって、pad1+遺伝子は生育に必須であった。

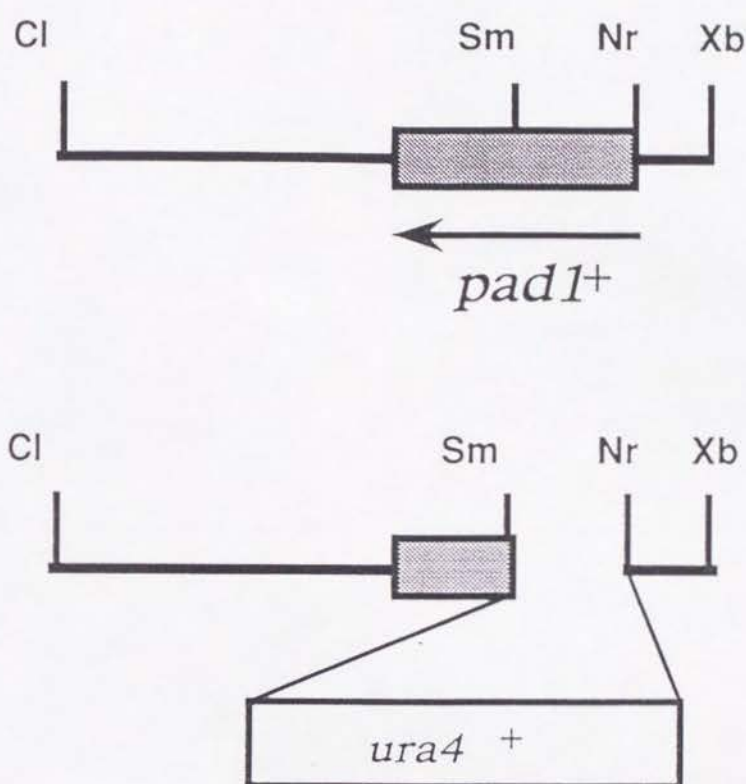
pad1+遺伝子破壊株の終末表現型を観察した（図A-9）。一方のpad1+遺伝子がura4+遺伝子の置換挿入によって破壊されたヘテロ二倍体を孢子形成させ、ウラシル非存在下で発芽させた。細胞が伸長し、異常な形態の核を持った細胞がDAPI染色により、観察された。また、pad1+遺伝子を含むプラスミドを導入した一倍体pad1+遺伝子破壊株を非選択的培地で生育させ、プラスミドを欠失した細胞の示す表現型を観察した。伸長し、異常な核を持つ細胞が、DAPI染色により観察された。pad1+遺伝子産物の機能のひとつは、



図A-7. pad1+遺伝子産物の同定

抗pad1抗体を用いたイムノブロット法により、35kdのpad1+遺伝子産物を同定した。3'末端を100塩基足らず欠損したpST23導入株では、33kdの遺伝子産物が同時に認識された。pap1+遺伝子を持つ多コピープラスミドを導入した株では、pad1+遺伝子産物の量には変化がない。



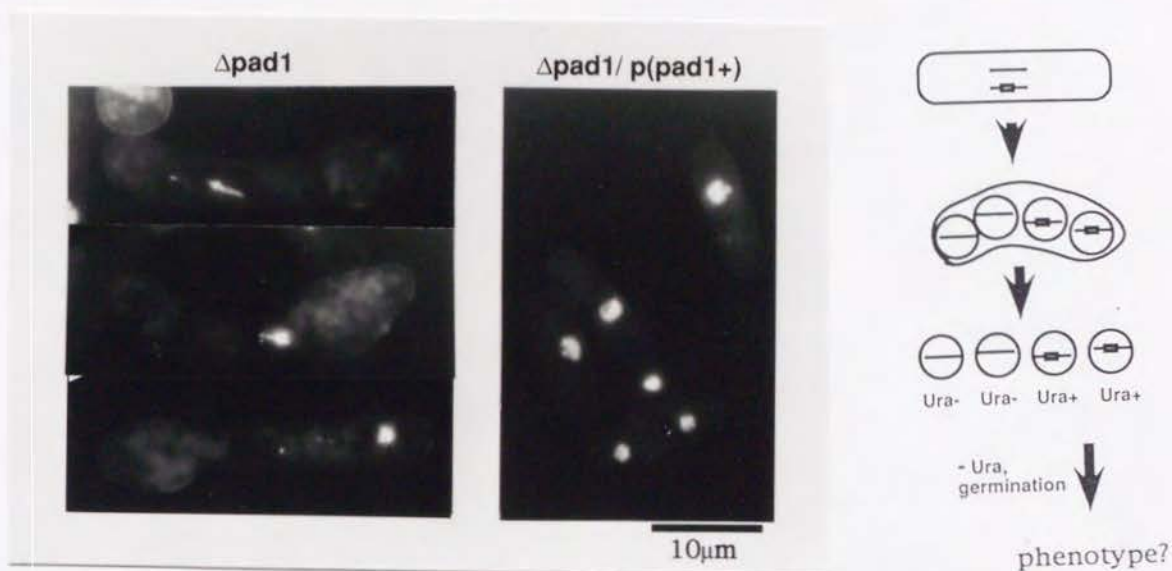


図A-8. *pad1*<sup>+</sup>遺伝子破壊の構成

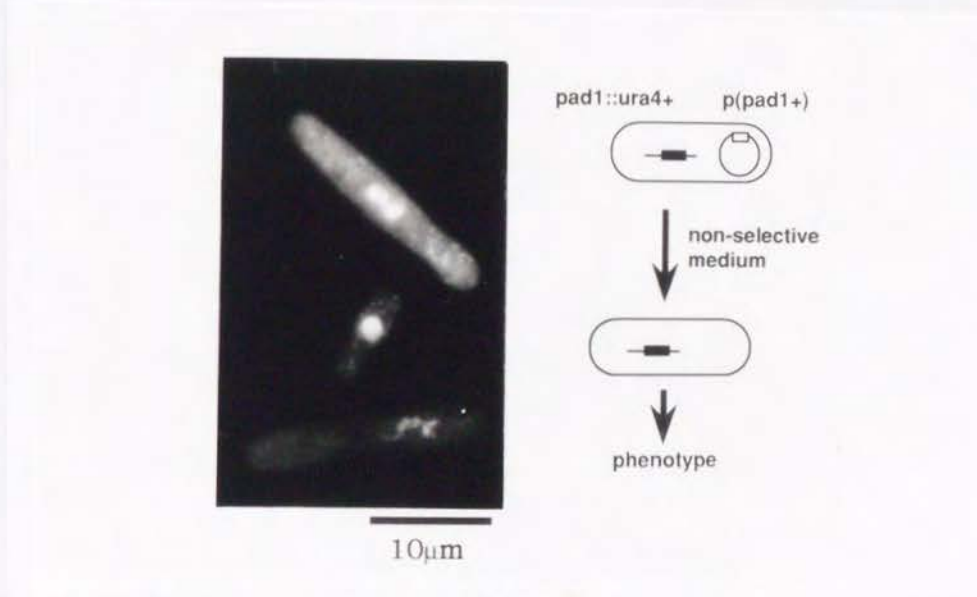
*pad1*<sup>+</sup>遺伝子中のNruI部位からSmaI部位までの約350bpを切り出し、ここに*ura4*<sup>+</sup>遺伝子を挿入した。ここから、約2.8kbのXbaI/ClaI断片を切り出し、*S. pombe*二倍体株に導入した。矢印は遺伝子の向きを示す。

Cl: ClaI, Sm: SmaI, Nr: NruI, Xb: XbaI

a



b



図A-9.  $pad1+$ 遺伝子破壊株の表現型

(a) 選択的条件下での発芽による観察

$ura4+$ 遺伝子の置換挿入によって破壊された $pad1$ 遺伝子を持つヘテロ二倍体を、ウラシルを含まない培地で孢子形成、発芽させることにより、 $pad1+$ 遺伝子破壊株の表現型を観察した。細胞のDAPI染色像を示した。

(b) プラスミド欠落法による観察

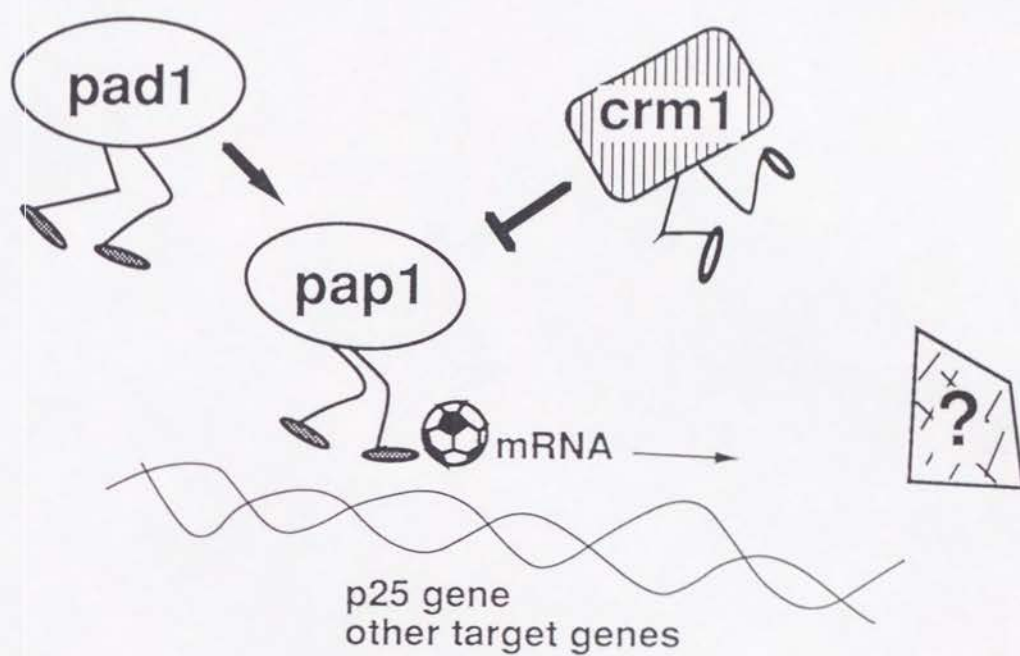
$pad1+$ 遺伝子を含むプラスミドを導入して致死性を相補させた $pad1+$ 遺伝子破壊株を、非選択的培地で培養することにより、プラスミドを欠落して致死となったと考えられる異常な細胞を観察した。

核形態の維持に関与することかもしれない。

crm1cs変異は低温感受性で染色体の高次構造に異常をきたす変異として分離された（Adachi and Yanagida 1989）。表現型は多面的で、低温感受性、スタウロスポリン耐性のほかに、 $\text{Ca}^{++}$ に超感受性となっていること、分子量25kdのタンパク質（p25）が異常に蓄積することがわかっていた。

crm1+遺伝子産物も、p25タンパク質も、機能は不明であるが、今回、本研究により分離されたpad1+遺伝子産物と共に、分裂酵母AP-1因子pap1との密接な関連が示唆された（図A-10）。





図A-10. モデル

pap1依存的な転写を、pad1は正に、crm1は負に制御すると考えられる。

## 材料と方法

### 酵母株、大腸菌株、薬剤

本研究に用いた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、すべて972h<sup>+</sup>及び975h<sup>-</sup>に由来する。基本的な取り扱いとは Gutz et al. (1974)、Mitchison (1970) に従った。目的に応じて以下の大腸菌株を使用した。プラスミドの調製にはMM294、融合タンパク質の発現にはBL21を用いた。スタウロスポリンは Kyowa Hakko Co. の Nakano 博士にご供与頂いた。DMSOに0.2mg/mlの濃度に溶解し小分けにして-20℃で保管し、使用直前にエタノールで10倍に希釈して用いた。

### スタウロスポリン耐性を付与する遺伝子の単離

スタウロスポリン超感受性株としてh-leu1 sts1-5; h-leu1 sts2-6; h-leu1 sts3-15、野生株としてHM123 (h-leu1) を用いた。これらをリチウム法 (Ito et al. 1983) により、pDB248 (Beach and Nurse 1981; Beach et al. 1982; Hirano et al. 1988) をベクターとする*S.pombe*ゲノムライブラリーで形質転換した。Leu<sup>+</sup>の形質転換体をsts変異株は0.3 µg/ml、野生株は0.5 µg/mlのスタウロスポリンを含むYPD寒天培地にレプリカして、スタウロスポリン耐性を判定した。スタウロスポリン耐性とLeu<sup>+</sup>のsegregation解析により、耐性がプラスミドに由来することを確認し、Nasmyth and Reed (1980) に従い、プラスミドを回収した。

### DNAおよびRNAの取り扱い

DNAおよびRNAの基本的取扱いは、Maniatis et al. (1982) に従った。

### DNA塩基配列決定

Sanger et al. (1977) によるジデオキシ法で行った。stepwise deletion (Henikoff 1984; Yanisch-Perron et al., 1985)により作製した2本鎖プラスミドDNAを鋳型として(Hattori and Sakaki 1986)塩基配列を決定した。Bluescript KS+ (Stratagene)をベクターに用いた。塩基配列決定した領域はそれぞれ結果に示した。

### 遺伝子破壊

ワンステップ遺伝子置換法によって行った(Rothstein 1983; Grimm et al., 1988)。結果に示す制限酵素部位にura4<sup>+</sup>遺伝子を挿入した。

## 抗体作成

基本的にHarlow and Lane (1988)に従った。T7プロモーターを持つプラスミドベクター pAR3038を用いた(Studier and Moffat 1986)。T7プロモーターの下流にpad1+遺伝子のORF中にあるNruI部位以降をつなぎ、大腸菌で発現させて分子量約40kdの融合蛋白質を得た。これをSDS-PAGEで粗精製して回収し、ウサギに免疫して抗pad1抗血清を得た。

## 間接蛍光抗体法

基本的にHagan and Hyams (1988)に従った。

アフィニティ精製した抗体を濃縮し、PEMBALバッファーで5倍希釈して一次抗体とした。二次抗体は、FITC標識したヤギ抗ウサギ抗体を200倍希釈して用いた。

## イムノプロット法

適当な培地中で対数増殖期にある分裂酵母細胞を回収し、TEGバッファー(50mM Tris, 1mMEDTA, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mMPMSF)中で、ガラスビーズにより破碎した。14000rpm、10分遠心して上清を回収し、再び遠心を繰り返した。上清を回収し、蛋白量を測定したうえで、SDS-PAGEに用いた。シグナルの検出に、HRP標識した抗ウサギ抗体、および、ECL検出キット(Amersham)を用いた。



- Adachi, Y. and Yanagida, M. (1989). Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutation in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1*<sup>+</sup> which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and at its periphery. *J. Cell Biol.*, 108, 1195-1207.
- Arndt, K. T., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1989). A suppressor of a *HIS4* transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell*, 56, 527-537.
- Axton, J. M., Dombradi, V., Cohen, P. T. W. and Glover, D. M. (1990). One of the protein phosphatase 1 isozymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell*, 63, 33-46.
- Beach, D. and Nurse, P. (1981). High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 290, 140-142.
- Beach, D., Piper, M. and Nurse, P. (1982). Construction of *Schizosaccharomyces pombe* gene bank in a shuttle vector and its use to isolate genes by complementation. *Mol. Gen. Genet.*, 187, 326-329.
- Booher, R., and Beach, D. (1989). Involvement of a type 1 protein phosphatase encoded by *bws1*<sup>+</sup> in fission yeast mitotic control. *Cell*, 57, 1009-1016.
- Brewis, N. D., Street, A. J., Prescott, A. R. and Cohen, P. T. W. (1993). PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *The EMBO Journal*, 12(3), 987-996.
- Charbonneau, H. and Tonks, N. K. (1992). 1002 protein phosphatases? *Annual Review of Cell Biology*, 8, 463-493.
- Cohen, P. (1989). The structure and function of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 453-508.
- Cohen, P. T. W., Brewis, N. D., Hughes, V. and Mann, D. J. (1990). Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Letters*, 268, 355-359.
- Costello, G., Rodgers, L., and Beach, D. (1986). Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Curr. Genet.*, 11, 119-125.

Cyert, M. S., Kunisawa, R., Kaim, D., and Thorner, J. (1991). Yeast homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7376-7380.

da Cruz e Silva, O. B., da Cruz e Silva, E. F. and Cohen, P. T. W. (1988). Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning. *FEBS Letters*, 242, 106-110.

Doonan, J. H. and Morris, N. R. (1989). The *bimG* gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell*, 57, 987-996.

Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D. and Newport, J. (1988). The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, 54, 423-431.

Dunphy, W. G. and Kumagai, A. (1991). The *cdc25* protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 67, 189-196.

Fantes, P. (1981). Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method. *J. Bacteriol.*, 146, 746-754.

Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., P., N. and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell*, 54, 433-439.

Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F. and Kirschner, M. W. (1991). *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates  $p34^{cdc2}$ . *Cell*, 67, 197-211.

Gould, K. L., and P. Nurse. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 342, 39-45.

Gridley, T., Gray, D. A., Orr-Weaver, T., Soriano, P., Barton, D. E., Francke, U. and Jaenisch, R. (1990). Molecular analysis of the *Mov 34* mutation: Transcript disrupted by proviral integration in mice is conserved in *Drosophila*. *Development*, 109, 235-242.

Grimm, C., Kohli, J., Murray, J. and Maundrell, K. (1988). Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene



disruption and replacement using the *ura4<sup>+</sup>* gene as a selectable marker. Mol. Gen. Genet., 215, 81-86.

Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Lopreno, N. (1974). *Schizosaccharomyces pombe*. In R. C. King (Eds.), Handbook of genetics 1 (pp. 395-446.). New York: Plenum Press.

Hagan, I. and Hyams, J. S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J.Cell Sci., 89, 343-357.

Hanks, S. K., and Quinn, A. M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. Methods Enzymol. 200, 38-81.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies (a laboratory manual).

Hattori, M. and Sakaki, T. (1986). Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. Anal. Biochem., 152, 232-238.

Heary, A. M., Zolnierwicz, S., Stapleton, A. E., Goebel, M., DePaoli-Roach, A. A. and Pringle, J. R. (1991). CDC55, a *Schizosaccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. Mol. Cell. Biol., 11, 5767-5780.

Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene, 28, 351-359.

Hirano, T., Hiraoka, Y. and Yanagida, M. (1988). A temperature sensitive mutation of the *S. pombe* gene *nuc2<sup>+</sup>* that encodes a nuclear scaffold-like protein blocks spindle elongation in mitotic anaphase. J. Cell Biol., 106, 1171-1183.

Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. Cell, 50, 823-829.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J.Bacteriol., 153, 163-168.



Izumi, T., Walker, D. H. and Maller, J. L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol. Biol. Cell*, 3, 927-939.

Kinoshita, N., Goebel, M. and Yanagida, M. (1991b). The fission yeast *dis3<sup>+</sup>* gene encodes a 110-kDa essential protein implicated in mitotic control. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 5839-5847.

Kinoshita, N., Ohkura, H. and Yanagida, M. (1990). Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell*, 63, 405-415.

Kinoshita, N., Yamano, H., Le Bouffant-Sladeczek, F., Kurooka, H., Ohkura, H., Stone, E. M., Takeuchi, M., Toda, T., Yoshida, T. and Yanagida, M. (1991a). Sister-chromatid separation and protein dephosphorylation in mitosis. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology "The Cell Cycle"* 57, 621-628.

Kinoshita, N., Yamano, H., Niwa, H., Yoshida, T. and Yanagida, M. (1993). Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Cell*, 7, 1059-1071.

Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell*, 70, 139-151.

Lee, M. G. and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2<sup>+</sup>*. *Nature*, 327, 31-35.

Liu, Y., Ishii, S., Tokai, M., Tsutsumi, H., Ohki, O., Akada, R., Tanaka, K., Tsuchiya, E., Fukui, S., and Miyakawa, T. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* genes (*CMP1* and *CMP2*) encoding calmodulin-binding proteins homologous to the catalytic subunit of mammalian protein phosphatase 2B. *Mol. Gen. Genet.*, 277, 52-59.

Lohka, M. J., Hayes, M. K. and Maller, J. L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. 85, 3009-3013.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mann, J. D., Dombrádi, V., and Cohen, P. T. W. (1993). *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a *SIT4* mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *EMBO J.*, 12, 4833-4842.

Masui, Y. and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation. *J. Exp. Zool.*, 177, 129-146.

Matsumoto, T. and Beach, D. (1991). Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an intereacting GTPase. *Cell*, 66, 347-360.

Matsumoto, T. and Beach, D. (1993). Interaction of the *pim1/spi1* mitotic checkpoint with a protein phosphatase. *Molecular Biology of the Cell*, 4, 337-345.

Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast; a highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 10857-10864.

Millar, J. B. A., Lenaers, G. and Russell, P. (1992a). Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *EMBO J.*, 11, 4933-4941.

Millar, J. B. A., Russell, P., Dixon, J. E. and Guan, K. L. (1992b). Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast. *EMBO J.*, 11, 4943-4952.

Mitchison, J. M. (1970). Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Cell Physiol.*, 4, 131-165.

Mizukami, T., Chang, W. I., Garkavsev, I., Kaplan, N., Lombardi, D., Matsumoto, T., Niwa, O., Kounosu, A., Yanagida, M., Marr, T. G. and Beach, D. (1993). A 13 kb resolution cosmid map of the 14 Mb fission yeast genome by nonrandom sequence-tagged site mapping. *Cell*, 73, 121-132.

Nasmyth, K. and Reed, S. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell cycle gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 2119-2123.

Nurse, P., Thuriaux, P., and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, 146, 167-178.



Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T. and Yanagida, M. (1988). Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* *dis* genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *Cell*, 7, 1465-1473.

Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. and Yanagida, M. (1989). The fission yeast *dis2<sup>+</sup>* gene required for chromosome disjoining encode one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*, 997-1007.

Ohkura, H. and Yanagida, M. (1991). *S. pombe* gene *sds22<sup>+</sup>* essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell*, 64, 149-157.

Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu, T., Matsubara, K. and Nishimoto, T. (1987). Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (*RCC1*) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev.*, 1, 585-593.

Ottillie, S., Chernoff, J., Hannig, G., Hoffman, C. S. and Erikson, R. L. (1991). A fission-yeast gene encoding a protein with feature of protein-tyrosine-phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3455-3459.

Parker, L. L., Walter, S. A., Young, P. G. and Piwnicka-Worms, H. (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. 363, 736-738.

Posas, F., Casamayor, A., Morral, N., and Ariño, J. (1992). Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(June 15), 11734-11740.

Ronne, H., Carlberg, M., Hu, G.-Z. and Nehlin, J. O. (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: Effects on cell growth and bud morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 4876-4884.

Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.*, 101, 202-211.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25<sup>+</sup>* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, 45, 145-153.



Sneddon, A. A., Cohen, P. T. W., and Stark, M. J. R. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *The EMBO Journal*, 9, 4339- 4346.

Russell, P. and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1<sup>+</sup>*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, 49, 559-567.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.

Shimanuki, M., Goebel, M., Yanagida, M. and Toda, T. (1992). Fission yeast *sts1<sup>+</sup>* gene encodes a protein similar to the chicken lamin B receptor and is implicated in pleiotropic drug-sensitivity, divalent cation-sensitivity, divalent cation sensitivity, and osmoregulation. *Molecular Biology of the Cell*, 3, 263-273.

Smith, L. D. and Ecker, R. E. (1971). The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.*, 25, 232-247.

Stone, E. M., Yamano, H. and Kinoshita, N. (1993). Mitotic regulation of protein phosphatases by the fission yeast *sds22* protein. *Current Biology*, 3(1), 13-26.

Studier, F. W. and Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.*, 189, 113-130.

Sutton, A., Immanuel, D. and Arndt, K. T. (1991). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 2133-2148.

Toda, T., Shimanuki, M., Saka, Y., Yamano, H., Adachi, Y., Shirakawa, M., Kyogoku, Y. and Yanagida, M. (1992). Fission yeast *pap1*-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, *crm1*. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5474-5484.

Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M. (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes & Development*, 5, 60-73.

- Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *The EMBO Journal*, 12, 1987-1995.
- Toda, T., Yamamoto, M., and Yanagida, M. (1981). Sequential alterations in the nuclear chromatin region during mitosis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: video fluorescence microscopy of synchronously growing wild-type and cold sensitive *cdc* mutants by using a DNA-binding fluorescent probe. *J. Cell Sci.*, 52, 271-287.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- Wilson, R. B., Brenner, A. A., White, T. B., Engler, M. J., Gaughran, J. P. and Tatchell, K. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *SRK1* gene, a suppressor of *bcy1* and *ins1*, may be involved in protein phosphatase function. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 505-510.
- Woods, A., Sherwin, T., Sasse, R., MacRae, T. H., Bines, A. J., and Gull, K. (1989). Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *The Journal of Cell Science*, 93, 491-500.
- Wu, L. and Russell, P. (1993). Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature*, 363, 738-741.
- Yanagida, M., Kinoshita, N., Stone, E. M., and Yamano, H. (1992). Protein phosphatases and cell division cycle control. In *Regulation of the eukaryotic cell cycle*. (pp. 130-146). Chichester: Wiley.
- Yanisch-Perron, C., Viera, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13m18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103-119.



## 謝辞

5年間、指導してくださった柳田充弘教授に感謝します。研究とはどういうものであるのか、ものを考えるということがどういうことであるのか、私の頑なな頭に、絶えず、教えてくださいました。ありがとうございました。登田隆博士には、科学の手ほどきから教えを受け、また、研究生活のあり方を教えていただきました。感謝いたします。丹羽修身博士、中世古幸信博士には、毎日の研究生活の上で、いろいろなことを教えていただきました。感謝いたします。すばらしい研究環境をつくってくださった研究室のすべての皆様に、感謝いたします。

僕等はたよりない子供だから  
僕等のあはれな感触では  
わづかな現はれた物しか見えはしない。  
僕等は遙かの丘の向うで  
ひろびろとした自然に住んでる  
かくれた万象の密語をきき  
見えない生き物の動作をかんじた。

詩人は、自然の背後に隠れて居るものを恐れましたが、科学はそれに立ち向かう手段です。未熟な私ですが、今後の人生においても、構造研での修行が役立つと信じています。ありがとうございました。